

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Institute für Infektionsmedizin
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Kommissarische Leitung: Prof. Dr. med. Barbara Gärtner



**Microarray-basierte Charakterisierung von *Staphylococcus aureus*-
Isolaten aus Manhiça (Mosambik) und Münster (Deutschland)**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2017

vorgelegt von Sabine Schubert
geboren am 06.09.1989 in Lüdinghausen

Zusammenfassung

Staphylococcus aureus ist eines der führenden Pathogene weltweit und hat als opportunistischer Erreger die Fähigkeit zur Invasion und Kolonisation. In industrialisierten Regionen gibt es hierzu schon viele Daten, in Entwicklungsländern hingegen fehlen differenzierte Studien bislang. Ziel dieser prospektiven Querschnittsstudie war es daher strikt ambulant erworbene *Staphylococcus aureus*-Isolate in Mosambik und Deutschland unter kontrollierten, identischen Bedingungen zu gewinnen und zu analysieren. Zur Analyse wurde die Microarray-Technologie eingesetzt, mit der das gesamte Genrepertoire eines Bakterienisolats auf einmal untersucht werden kann, einschließlich Resistenzgenen, Virulenzgenen und klonaler Komplex-Zuordnung. Verglichen wurden diese Daten nicht nur zwischen Deutschland und Mosambik, sondern auch zwischen invasiven und kolonisierenden Bakterien.

Einige klonale Komplexe waren in beiden Regionen häufig, also pandemisch (CC5, CC8, CC15), andere waren spezifisch für die eine oder andere Region. CC45 und CC30 zeigten eine europäische Dominanz, CC121, CC152 und CC88 hingegen eine afrikanische. Die Diversität der klonalen Komplexe überwog in Deutschland. Auffallend war die exorbitante Prädominanz des klonalen Komplexes CC121 mit 32% in Mosambik, sowie seine höchst signifikante Assoziation mit Invasivität.

Resistenzgene wurden insgesamt häufiger in Mosambik nachgewiesen. Dies betraf die Gene, die Resistenzen gegen Betalaktame (*blaZ*: 90% vs. 69%), Erythromycin/Clindamycin (*ermC*: 27% vs. 6%), Tetrazyklin (*tetK*: 27% vs. 4,5%; *tetM*: 20% vs. 1%) und Fosfomycin (*fosB*: 72% vs. 54,5%) vermitteln. Lediglich *ermA* wurde häufiger in Deutschland detektiert (6% vs. 1%). Die MRSA-Prävalenz war mit 3% in beiden Regionen sehr gering.

Auch das Vorkommen von Virulenzgenen überwog in Mosambik. *sasG* wies in Mosambik eine Assoziation zu Kolonisierung auf, *egc* zu Invasivität, beides war jedoch mutmaßlich durch Klonalität verzerrt. Darüber hinaus ließ sich der Kapseltyp 5 signifikant häufiger in invasiven Isolaten nachweisen, der Kapseltyp 8 dagegen in kolonisierenden. Das eindrucklichste Ergebnis dieser Arbeit war die Prädominanz von PVL in Mosambik (46,5% vs. 1,5%) und dort in invasiven Stämmen (54% vs. 39%). Es zeigte sich eine Korrelation von PVL und den charakteristisch afrikanischen klonalen Komplexen CC88 und insbesondere CC152.

Um Krankheiten und deren Ausbreitung zu verstehen und effektiv zu behandeln ist es essentiell das Genrepertoire der Erreger zu kennen. Diese signifikanten geographischen Unterschiede in der *Staphylococcus aureus*-Population unterstreichen die Notwendigkeit weiterer Forschung in ressourcenarmen Ländern über klassische Tropenkrankheiten hinaus.

Summary

Staphylococcus aureus is one of the world's leading pathogens and as an opportunistic pathogen it has the ability for invasion or colonization. In industrialized regions a lot of data on this topic already exist, but in developing countries differentiated studies are missing so far. The aim of this prospective cross-sectional study was therefore to collect and analyze strictly community-acquired *Staphylococcus aureus* isolates in Mozambique and Germany under controlled, identical conditions. Microarray technology was used to analyze the entire gene repertoire of a bacterial isolate at once, including resistance genes, virulence genes and clonal complex assignment. These data were compared not only between Germany and Mozambique, but also between invasive and colonizing bacteria.

Some clonal complexes were common in both regions, therefore pandemic (CC5, CC8, CC15), others were specific for one region or another. CC45 and CC30 were predominant in Europe, while CC121, CC152 and CC88 were predominant in Africa. The diversity of clonal complexes predominated in Germany. Striking was the exorbitant predominance of the clonal complex CC121 with 32% in Mozambique as well as its highly significant association with invasiveness.

Resistance genes were detected more frequently in Mozambique. These were the genes conferring resistance against beta-lactams (*blaZ*: 90% vs. 69%), erythromycin/clindamycin (*ermC*: 27% vs. 6%), tetracycline (*tetK*: 27% vs. 4.5%; *tetM*: 20% vs. 1%) and fosfomycin (*fosB*: 72% vs. 54.5%). Only *ermA* was more common in Germany (6% vs. 1%). The MRSA prevalence was very low at 3% in both regions.

The occurrence of virulence genes also predominated in Mozambique. *sasG* was associated with colonization in Mozambique, *egc* with invasiveness, but both were presumably biased by clonality. In addition, capsule type 5 was significantly more frequently detected in invasive isolates, whereas capsule type 8 was found in colonizing ones. The most impressive result of this study was the predominance of PVL in Mozambique (46,5% vs. 1,5%) and respectively in invasive diseases (54% vs. 39%). A correlation of PVL and the characteristic African clonal complexes CC88 and in particular CC152 was shown.

In order to understand and effectively treat diseases and their spread, it is essential to know the gene repertoire of the pathogens. These significant geographical differences in the *Staphylococcus aureus* population underscore the need for further research in resource-poor countries beyond classical tropical diseases.

Abkürzungsverzeichnis

µm/µl	Mikrometer/Mikroliter
ag	ausgeschlossen
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaare
CA-	ambulant erworben (community acquired)
CC	klonaler Komplex
CISM	Centro de Investigação em Saúde de Manhiça
CoNS	Koagulase-negative Staphylokokken
CRF	Case Report Form
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DNA	Desoxyribonukleinsäure
HA-	nosokomial erworben (health care acquired)
IBMT	Institut für Biomedizinische Technik
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization-Time of flight
MGEs	mobile genetische Elemente
MLSB	Makrolid, Lincosamid, Streptogramin B
MLST	Multilokussequenztypisierung
MM	Manhiça in Mosambik
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSCRAMM	microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MTA	Medizinisch-technische Assistentin
MW	Münster in Westfalen
N	nasal/kolonisierend/kommensal
nn	nicht nachgewiesen
OB	other, blood/krankheitsverursachend/invasiv
OPD	Outpatient Department
PBP2A	Penicillin-bindendes Protein 2A
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
RR	relatives Risiko
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SCVs	small colony variants

SLV	single-locus variant
SOP	standard operating procedures
<i>spA</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> Protein A
SSSS	staphylococcal scaled skin syndrome
ST	Sequenztyp
tRNA	transfer-Ribonukleinsäure
TSS	toxic shock syndrome
V.a.	Verdacht auf

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	8
1.1	Familie der Staphylokokken	8
1.2	Resistenzfaktoren und –mechanismen.....	9
1.2.1	β-Laktame	10
1.2.2	Glykopeptide	10
1.2.3	Makrolide	10
1.2.4	Oxazolidinone	11
1.2.5	Tetrazykline.....	11
1.2.6	Fosfomycin.....	11
1.2.7	weitere	11
1.2.8	Antibiotikatherapie der S. aureus-Infektion	11
1.3	Virulenzfaktoren	12
1.3.1	Adhäsionsfaktoren	13
1.3.2	Biofilm	13
1.3.3	Umgehung der Wirtsabwehr.....	13
1.3.4	Exoenzyme	13
1.3.5	Toxine und Superantigene	14
1.3.6	Regulation der Virulenzfaktoren	14
1.4	Klinische Aspekte	14
1.5	Epidemiologie.....	15
1.6	Typisierungsmethoden	16
1.6.1	Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)	17
1.6.2	Multilokussequenztypisierung (MLST).....	17
1.6.3	spA-Typisierung	17
1.6.4	Microarray-Technologie.....	18
1.7	Staphylococcus aureus in Afrika.....	18
1.8	Zielsetzung.....	19
2	Methodik und Material.....	21
2.1	Stammsammlung	21
2.1.1	Probanden/Patienten.....	21
2.1.2	Einschlusskriterien/CRF	21
2.1.3	Bakterienisolatsammlung	21
2.2	Stammanalyse	23
2.2.1	DNA-Extraktion und Konzentrationsmessung.....	23
2.2.2	DNA-Markierung/-Amplifikation	24
2.2.3	Microarray-Analyse	24
2.2.4	Statistische Auswertung	25

2.3	Materialnachweis	27
3	Ergebnisse.....	28
3.1	Forschungsaufenthalt in Manhiça.....	28
3.2	Klonale Komplexe	30
3.2.1	Absolute Häufigkeiten	30
3.2.2	Verteilung in den Regionen	31
3.2.3	Verteilung in kommensalen und invasiven Stämmen.....	33
3.3	Resistenzgene	35
3.4	Virulenzgene	36
3.4.1	Klassische Toxingene	36
3.4.2	Hämolysin- und Proteasegene	37
3.4.3	Superantigen- und Enterotoxin- ähnliche Gene	38
3.4.4	Kapsel und Biofilm assoziierte Gene	39
3.4.5	Adhäsionsfaktor/MSCRAMM-Gene	40
3.5	Detaillierte Verteilung der klonalen Komplexe in ausgewählten Genen	40
3.5.1	Resistenzgene	41
3.5.2	Virulenzgene	45
4	Diskussion.....	51
5	Literaturverzeichnis	65
6	Publikationen.....	71
7	Danksagung.....	72
8	Anhang.....	73
8.1	Case Report Form.....	73
8.2	vereinfachter Case Report Form für Manhiça	81
8.3	Protokoll DNA-Aufreinigung.....	82
8.4	Protokoll Microarray-Messung.....	82
8.5	Tabelle der analysierten Gene und ihre Häufigkeit	85

1 Einleitung

Staphylococcus aureus ist weltweit ein extrem erfolgreicher opportunistischer Erreger. Zum einen besiedelt er als einfacher Kommensale regelmäßig Haut und Schleimhäute, hat darüber hinaus aber das Potential, eine große Vielfalt an Krankheiten zu verursachen. Die Spanne der durch eine *S. aureus*-Infektion ausgelösten Erkrankungen reicht von relativ harmlosen Manifestationen wie Follikulitis und Furunkulose über kompliziertere wie Erysipel, tiefe Abszesse und Osteomyelitis bis hin zu lebensbedrohlichen Erkrankungen wie Pneumonie, Endokarditis oder Sepsis [1].

Bei Menschen hat *S. aureus* eine Nischenpräferenz für den Nasenvorhof, ist aber auch auf gesunder Haut, einschließlich Achselhöhle und Perineum, zu finden [2, 3]. Die Kolonisierungsrate variiert von 10% bis 40% sowohl in der Bevölkerung als auch in der Krankenhausumgebung [4, 5]. Durch begünstigende Faktoren, wie beispielsweise ein geschwächtes Immunsystem oder eine Hautverletzung, kann *S. aureus* seinen Wirt allerdings infizieren und somit vom Kommensalen zum Pathogen werden [2].

1.1 Familie der Staphylokokken

Mitglieder der Gattung Staphylokokkus sind gram positive Kokken von 0,5-1,5µm Durchmesser, die einzeln und in Paaren, Tetraden, kurzen Ketten und irregulären traubenförmigen Anhäufungen vorkommen. Ogston führte den Namen *staphylococcus* (vom Griechischen staphylé für Weintraube und Kokkós für Kern, Korn) ein, um Mikrokokken zu beschreiben, die für Entzündung und Vereiterung verantwortlich waren [6]. Seit 2010 zählen die Staphylokokken nicht mehr zur Familie der *Micrococaceae*, sondern geben einer eigenen Familie den Namen *Staphylococcaceae* [7]. Staphylokokken sind unbeweglich, nicht sporenbildend, üblicherweise Katalase positiv, und äußerst anspruchslos. Die meisten Spezies sind fakultative Anaerobier und bilden keine oder nur eine begrenzte Kapsel aus [8].

Die Gattung Staphylokokkus beinhaltet 36 Spezies, von denen 16 beim Menschen vorkommen. Nur wenige Arten sind auch ohne prädisponierenden Faktoren wie Immunsuppression oder implantiertem Fremdmaterial pathogen. Innerhalb seiner Gattung ist *S. aureus* ein individuelles Pathogen, denn im Vergleich zu seinen Koagulase-negativen Artverwandten (CoNS) ohne Toxingene und mit maximal zehn Adhäsionsgenen weist *S. aureus* mehr als 30 Toxin- und 20 Adhäsionsgene auf [9-12]. Demzufolge kommt *S. aureus* aus medizinischer Sicht eine besondere Bedeutung zu, da dieser Erreger deutlich virulenter als seine Artverwandten ist und damit in besonderem Maße zu Morbidität und Mortalität beiträgt.

Die Heterogenität der auslösbaren Erkrankungen und das ausgeprägte Vermögen Antibiotikaresistenzen zu entwickeln spiegeln die außergewöhnliche Fähigkeit von *S. aureus* wider sich an eine enorme Vielfalt von Umgebungen zu adaptieren und darin zu überleben [1]. *S. aureus* besitzt eine große Anzahl beweglicher genetischer Elemente (MGEs) exogenen Ursprungs, einschließlich Insertionssequenzen, Transposons, Bakteriophagen, Pathogenitäts- und Genominseln, welche spezifische Determinanten für Krankheiten und Antibiotikaresistenzen beinhalten [10, 13-15]. Das Vorhandensein dieser exogenen Elemente bestätigt die hohe Leistungsfähigkeit von *S. aureus* im horizontalen Gentransfer mit anderen Organismen, einschließlich solcher, die nicht zur Gattung der Staphylokokken gehören. Da dem Genaustausch in der Evolution eine Schlüsselrolle zukommt, ist die besondere genetische Plastizität eine wahrscheinliche Erklärung für den Erfolg von *S. aureus* sowohl als Kommensale als auch als krankheitsverursachender Keim [16].

1.2 Resistenzfaktoren und –mechanismen

S. aureus besitzt eine ausgeprägte Fähigkeit Resistenzen gegen antimikrobielle Substanzen auszubilden. Die Resistenz vermittelnden Gene können entweder intrinsisch auf dem Chromosom vorkommen oder via horizontalem Gentransfer erworben und dann auf einem Plasmid lokalisiert sein.

Tabelle 1: Übersicht über die Ansatzpunkte der Resistenzen gegen die verschiedenen Antibiotikaklassen und deren Lokalisation im Genom [18] (modifiziert).

Antibiotikaklasse	Resistenzgenbezeichnung	Ansatzpunkt
β-Laktam	<i>bla</i>	β-Laktamase
	<i>mecA</i>	PBP2A
Glykopeptid	<i>vanA</i>	veränderte Zielstruktur
Makrolid	<i>ermA</i>	Erythromycin Ribosom-Methylase
Lincosamide	<i>ermB</i>	
Streptogramin B	<i>ermC</i>	
Makrolid Streptogramin B	<i>msrA</i>	Makrolid-Streptogramin Resistenz ABC-Transporter
Linezolid Chloramphenicol Lincosamid	<i>cfr</i>	23S rRNA Methyltransferase
Tetrazyklin	<i>tetM</i>	Ribosomprotektion
	<i>tetK</i>	Aktiver Efflux
Fosfomycin	<i>fosB</i>	Metallothioltransferase
verschiedene	<i>sdrM</i>	Effluxpumpen

Einige wichtige Resistenzmechanismen werden nachfolgend genauer beschrieben. Kursiv in Klammern angegeben findet sich fortan jeweils die Genbezeichnung, wie sie in dieser Arbeit verwendet wird.

1.2.1 β -Laktame

β -Laktame wie Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme verhindern bakterielles Wachstum, indem sie in die Zellwandsynthese eingreifen. Als sterisches Analogon zum D-Alanyl-D-Alanin der Peptidoglykanbausteine inhibieren sie die Transpeptidasen (Penicillin-bindende Proteine), die die einzelnen Zellwandbestandteile miteinander verbinden, irreversibel. *S. aureus* besitzt zwei verschiedene Mechanismen diesen bakteriostatischen Effekt zu umgehen. Durch Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika werden β -Laktamasen (*bla*) in den Bakterien induziert, die in der Lage sind den β -Laktamring der Substanzen aufzuspalten und sie somit zu inaktivieren. Um das zu vermeiden hat man die Möglichkeit gleichzeitig β -Laktamase-Inhibitoren zu verabreichen, die wiederum durch ihren eigenen β -Laktamring die Laktamasen irreversibel hemmen. Ein zweiter Mechanismus der β -Laktam-Resistenz, der für die Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Ausbildung eines veränderten Penicillin-bindenden Proteins (PBP2A, kodiert auf dem *mecA*-Gen) mit einer niedrigeren Affinität zu β -Laktam-Antibiotika. Trotz der hohen Resistenzraten von bis zu 75% der Stämme [17], bleiben Penicilline der Goldstandard der *S. aureus*-Therapie, sofern eine Sensibilität besteht.

1.2.2 Glykopeptide

Glykopeptide wie Vancomycin sind weniger effektiv gegenüber MSSA und sollten der Reservetherapie von schweren MRSA-Infektionen vorbehalten bleiben. Ihre Wirkweise beruht ebenfalls auf der Beeinflussung der Zellwandsynthese. Sie binden an das D-Alanyl-D-Alanin der Peptidoglykane und blockieren dadurch die Transpeptidylierung und Transglykosylierung. Eine intermediäre Resistenz resultiert aus einem vermehrten Vorkommen von D-Alanyl-D-Alanin-Resten in der Zellwand, welche die Glykopeptide „abfangen“ bevor sie ihr Ziel erreichen [18]. Die volle Glykopeptidresistenz wird durch Veränderung der Zielstruktur D-Alanyl-D-Alanin durch einen Laktatrest bewirkt, mit der Konsequenz einer niedrigeren Glykopeptidaffinität (*vanA*) [19].

1.2.3 Makrolide

Makrolide hemmen die Proteinbiosynthese von grampositiven Bakterien, indem sie das Weiterrücken des Ribosoms an der mRNA verhindern. Dieser Mechanismus kann umgangen werden, indem *S. aureus* eine Methylase (*erm*) bildet, welche Methylgruppen an die 23S rRNA bindet. Dies bewirkt eine sterische Veränderung, die die Affinität der Makrolide zu ihrem Angriffspunkt deutlich einschränkt. Die Expression von *erm* wird durch Makrolide induziert und kann *S. aureus* eine Kreuzresistenz gegenüber Ketoliden, Lincosamiden und Streptogramin B verleihen [20]. Dieser sog. MLSB-Resistenz Phänotyp wird mit dem Plättchendiffusions-D-Test

von Erythromycin und Clindamycin detektiert [21]. Eine weitere Strategie Resistenzen gegen Makrolide und Streptogramin B zu bilden ist der aktive Efflux der Antibiotika aus dem Bakterium. Die dazu notwendige Energie stellen die hierfür verantwortlichen ABC-Transporter (*msrA*) aus der Hydrolyse von ATP bereit [22].

1.2.4 Oxazolidinone

Linezolid bindet an die 23S rRNA der 50S ribosomalen Untereinheit und verhindert somit ebenfalls die Proteinbiosynthese der Bakterien. Ähnlich wie bei den Makroliden wird auch hier eine Methylase (*cfr*) gebildet, die Kreuzresistenzen gegen Antibiotika derselben Bindungsstelle ausbilden, wie Chloramphenicol, Clindamycin und Streptogramin A [23].

1.2.5 Tetrazykline

Die Wirkung der Tetrazykline beruht auf der Beeinträchtigung der Proteinbiosynthese, indem den Erregern die Bindung der tRNA an den mRNA-Ribosom-Komplex verhindert wird. Es wurden bislang zwei Mechanismen der Tetrazyklin-Resistenz in *S. aureus* identifiziert. Zum einen vermittelt das induzierbare *tetM* Gen eine ribosomale Protektion durch eine tRNA modifizierende Aktivität [24]; Zum anderen ist das *tetK* Gen für einen aktiven Efflux von Tetrazyklinen durch die Protonen bewegende Kraft des transmembranösen elektrochemischen Protonengradienten verantwortlich [25, 26].

1.2.6 Fosfomycin

Fosfomycin interferiert mit dem Einbau von Phosphoenolpyruvat in die N-Acetylmuraminsäure, die zum Aufbau der Bakterienwand notwendig ist. Dies geschieht dadurch, dass es als sterisches Analogon irreversibel an einen Cysteinrest im aktiven Zentrum der Pyruvyltransferase bindet. Dabei überträgt das Cystein eine Thiolgruppe auf das Fosfomycin. Als Resistenzmechanismus besitzt *S. aureus* eine Metallothioltransferase (*fosB*), die ebenfalls eine Thiolgruppe an das Fosfomycin abgibt und somit dessen Bindungsmöglichkeit an das Cystein erschöpft. Folglich steht wieder N-Acetylmuraminsäure für den Wandaufbau zur Verfügung.

1.2.7 weitere

Es existieren noch viele weitere Mechanismen zur Resistenzbildung von *S. aureus*. Ein signifikanter Resistenzfaktor dieser Arbeit ist beispielsweise noch das *sdrM* Gen. Dieses kodiert für ein Multidrug-Transportsystem, welches durch Effluxpumpen verschiedene antimikrobielle Substanzen wie Norfloxacin, Acriflavin und Ethidiumbromid aus dem Bakterium heraus transportieren kann [27].

1.2.8 Antibiotikatherapie der *S. aureus*-Infektion

Die Wahl eines Antibiotikums hängt von vielen Faktoren ab; Beispielsweise der Krankheit selbst, der lokalen Resistenzstatistik, dem Alter des Patienten, den Komorbiditäten oder

Allergien. *S. aureus* ist primär empfindlich gegenüber β -Laktam-Antibiotika, also Penicillinen, Cephalosporinen (Ausnahme: Ceftazidim) und Carbapenemen, des Weiteren Makroliden sowie Clindamycin, Fosfomycin, Glykopeptiden (Vancomycin, Teicoplanin), Rifampicin, Fusidinsäure und Linezolid. Fluorchinolone können wegen leichter Resistenzbildung als Primärtherapie nicht empfohlen werden. Fosfomycin und Rifampicin sollten nur in Kombination angewandt werden. Mittel der Wahl ist immer noch Penicillin, sofern der Erreger sensibel darauf ist. Da durch den Selektionsdruck bis zu 90% aller Stämme Penicillinasen bilden kombiniert man Penicilline mit einem Penicillinasebinder wie Clavulansäure, Sulbactam oder Tazobactam. MRSA sind häufig nicht nur gegen Isoxazolympenicilline, sondern auch gegen Cephalosporine und Carbapeneme resistent. Für Infektionen mit solchen Stämmen stehen als Reservemittel Clindamycin, Fusidinsäure und Fosfomycin zur Verfügung. Vancomycin, Teicoplanin und Linezolid sollten nur in letzter Instanz eingesetzt werden. Grundsätzlich sollten Infektionen mit MRSA in Zusammenarbeit mit einem Infektiologen behandelt werden. Die Gesamtbehandlungsdauer richtet sich nach dem klinischen Verlauf, sollte jedoch mindestens 7-10 Tage betragen. Nach Einsetzen einer klinischen Besserung kann eine initial eingeleitete parenterale Therapie häufig schon nach wenigen Tagen auf eine orale Behandlung umgesetzt werden (Sequenzialtherapie) [28].

1.3 Virulenzfaktoren

Neben den oben beschriebenen Resistenzfaktoren besitzt *S. aureus* auch eine umfangreiche Ausstattung mit Virulenzfaktoren. Dabei spielen sowohl strukturgebundene als auch Sekretionsprodukte eine Rolle in der Pathogenese der Infektion. Ein einzelner Virulenzfaktor kann verschiedene Funktionen in der Pathogenese haben. Andersherum können verschiedene Virulenzfaktoren die gleiche Funktion ausüben.

Tabelle 2: Übersicht über die Virulenzfaktoren, die zugehörigen Gene und damit assoziierten klinischen Syndrome [18] (modifiziert).

Virulenzfaktor beteiligt an	Ausgewählte Faktoren	Gene	Assoziierte klinische Syndrome
Adhärenz	MSCRAMMs (z.B. clumping factors, fibronectin-binding proteins, collagen and bone sialoprotein-binding proteins)	<i>clfA</i> , <i>clfB</i> , <i>fnbA</i> , <i>frbB</i> , <i>can</i> , <i>sdr</i> , <i>bbp</i>	Endokarditis, Osteomyelitis, septische Arthritis, Prothesen- und Katheterinfektionen
Persistenz	Biofilmmakkumulation (z.B. polysaccharide intercellular adhesion), small-colony variants and intracellular persistence	<i>ica</i> locus, <i>hemB</i> mutation	Rezidivierende Infektionen, zystische Fibrose, und o.g. Syndrome

Umgehung der Wirtsabwehr	Leukozidine, (z.B. PVL und γ -toxin), Kapselpolysaccharide (z.B. 5 und 8), Protein A, CHIPS, extrazelluläres Adhärenzprotein	PVL, <i>hlg</i> , <i>cap5</i> , <i>cap8</i> , <i>spa</i> , <i>eap</i>	Invasive Hautinfektionen und nekrotisierende Pneumonie, Abszesse
Gewebeinvasion/ Penetration	Proteasen, Lipasen, Nukleasen, Hyaluronatlyase, Phospholipase C und Metalloproteasen (Elastasen)	V8, <i>hysA</i> , <i>hla</i> , <i>plc</i> , <i>sepA</i>	Gewebsdestruktion und metastasierende Infektionen

1.3.1 Adhäsionsfaktoren

Um eine Infektion zu initiieren behilft sich *S. aureus* zahlreicher Oberflächenproteine, die „microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules“ (MSCRAMMs) genannt werden und die Adhärenz an das Wirtsgewebe vermitteln. MSCRAMMs binden Moleküle wie Kollagen (*cna*), Fibronectin (*fnb*) und Fibrinogen (*fib*) und scheinen eine Schlüsselrolle in der Initiierung von endovaskulären Infektionen, Knochen-, Gelenks- und Protheseninfektionen zu spielen [9, 29-31].

1.3.2 Biofilm

Sobald *S. aureus* am Wirtsgewebe oder Prothesenmaterial anhaftet ist es ihm möglich zu wachsen und auf unterschiedliche Weise zu persistieren. *S. aureus* kann zum Beispiel Biofilme (*bap*) auf Wirts- und Prothesenoberflächen bilden und darunter „verborgen“ von Wirtsabwehr und antimikrobiellen Substanzen unerkannt bleiben [8]. Die Fähigkeit Biofilme zu bilden ist ein Grund, warum beispielsweise Protheseninfektionen so schwer zu eradizieren sind ohne die Prothese zu entfernen [10, 14, 15]. Außerdem ist *S. aureus* in der Lage „small colony variants“ (SCVs) auszubilden. In vitro ist es SCVs möglich in Wirtszellen zu persistieren ohne diese signifikant zu beschädigen und so von Antibiotika und Wirtsabwehr nicht detektiert zu werden. Wenn sich die SCVs zu einem späteren Zeitpunkt wieder in den virulenteren Wildtyp zurückverwandeln, kann dieser potentiell erneut zu einer Infektion führen [6, 10, 11].

1.3.3 Umgehung der Wirtsabwehr

S. aureus hat viele andere Eigenschaften, die helfen dem Immunsystem des Wirtes während einer Infektion zu entgehen [12]. Ein Hauptabwehrmechanismus ist die Produktion einer Mikrokapsel, meist Typ 5 (*cap5*) oder Typ 8 (*cap8*), die Phagozytose verhindern und außerdem die Abszessbildung induzieren kann [2, 3]. Das MSCRAMM Protein A (*spa*) bindet an den Fc-Teil von Immunglobulinen, was zur Folge hat, dass eine Opsonierung verhindert wird.

1.3.4 Exoenzyme

Des Weiteren produziert *S. aureus* eine große Anzahl an Exoenzymen, membranaktiven Enzymen und Toxinen, die alle in den Erkrankungsmechanismus involviert sind. Hierzu zählen extrazelluläre Adhärenzproteine, die mit der Extravasation und Chemotaxis (*chp*) von

Neutrophilen am Ort der Infektion interferieren [12] oder die Hämolysine α - δ (*hla*), welche Erythrozyten und andere eukaryontische Zellen lysieren. Zusätzlich produziert *S. aureus* Leukozidine (*luk*), welche Leukozyten zerstören, indem sie Poren in deren Zellmembran einbringen [4]. Ein Beispiel hierfür ist das Panton-Valentine-Leukozidin (PVL), welches 1932 von Panton und Valentine als ein Homolog zum γ -Hämolysin beschrieben wurde [32]. Es ist auf einem mobilen Phagen kodiert und kann so auf andere Isolate übertragen werden. Die Prävalenz ist normalerweise niedrig (<2%) in MSSA und HA-MRSA [33] und beträgt nahezu 100% in CA-MRSA [34, 35]. PVL-positive *S. aureus*-Isolate sind überwiegend mit Haut- oder Weichteilinfektionen und schwerer nekrotisierender Pneumonie assoziiert [36].

Während einer Infektion produziert *S. aureus* zahlreiche Enzyme, wie Proteasen (*aur*, *spl*), Lipasen und Elastasen, die es ermöglichen in das Wirtsgewebe einzudringen, es zu zerstören und an andere Orte zu metastasieren.

1.3.5 Toxine und Superantigene

Einige *S. aureus*-Stämme sind in der Lage Superantigene zu produzieren, die zu verschiedenen Intoxikationen führen können, wie einer Lebensmittelvergiftung durch Enterotoxine (*se*, *egc*) oder eines „toxic shock syndromes“ (TSS) durch das TSS-Toxin (*tst1*) [37, 38]. Anders als die zuvor genannten Strukturkomponenten, können solche Superantigene (*ssl*) ein Sepsis-ähnliches Syndrom durch Initiierung eines „Zytokin-Ansturms“ hervorrufen. Einige Stämme können außerdem Epidermiolysine (*edin*) und die Exfoliativtoxine A (*etA*) und B (*etB*) produzieren, welche sich klinisch als generalisiertes „staphylococcal scaled skin syndrome“ (SSSS) oder als lokalisierte Form der Impetigo bullosa manifestieren [39].

1.3.6 Regulation der Virulenzfaktoren

Die Regulation der Expression von Virulenzfaktoren spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese von *S. aureus*. Um übermäßige metabolische Leistungen zu vermindern, findet die Expression nur dann statt, wenn das Bakterium es erfordert. Während einer Infektion, erleichtert die frühe Expression der MSCRAMM-Proteine die initiale Kolonisierung von Geweben, wohingegen die spätere Bildung von Toxinen die Ausbreitung erleichtert. Der akzessorische Genregulator (*agr*) ist ein sensibles System, welches eine kritische Rolle in der Regulation der Virulenz von *S. aureus* spielt. Die *agr*-Mutanten scheinen eine verminderte Virulenz zu haben, und gewisse *agr*-Typen sind mit bestimmten klinischen Syndromen assoziiert [40]. Neben *agr* gibt es weitere wichtige Regulatoren.

1.4 Klinische Aspekte

S. aureus-Infektionen gehen mit beträchtlicher Morbidität und Mortalität einher. Infizierte Krankenhauspatienten haben im Durchschnitt einen dreimal längeren Krankenhausaufenthalt (14,3 vs. 4,5 Tage), dreimal höhere Kosten (US\$ 48,82 vs. \$14,14) und ein fünffach erhöhtes

Risiko im Krankenhaus zu sterben (11,2% vs. 2,3%) [41, 42]. Die Mortalitätsrate durch invasive *S. aureus*-Infektionen wird zwischen 19% und 34% angegeben [5, 42-44]. Zusammen mit dem zunehmenden Problem der mehrfachen Antibiotikaresistenzen, unterstreichen diese Zahlen die enorme soziale und ökonomische Belastung, die von *S. aureus* ausgeht.

Das antimikrobielle Überwachungsprogramm SENTRY, welches Daten von den USA, Kanada, Lateinamerika, Europa und dem Westpazifik sammelt, erfasste von 1997-1999 die folgende Verteilung von *S. aureus* bedingten Infektionen: 1. 39,2% Haut- und Weichteilinfektionen, 2. 23,2% Infektionen der unteren Atemwege, 3. 22% Blutkreislaufinfektionen inkl. infektiöser Endokarditis und 4. 15,6% andere Infektionen wie solche des Harntrakts, Gehirns und Abdomens [45].

Von diesen lokalisierten oder generalisierten Infektionen, bei denen der Organismus direkt am Ort der Infektion präsent ist, lassen sich solche unterscheiden, bei denen der Erreger indirekt aus der Entfernung durch Sekretion von Toxinen agiert. Bekannte Beispiele dafür sind die jedoch relativ seltenen Lebensmittelvergiftungen, „toxic shock syndrome“ (TSS) oder „staphylococcal scaled skin syndrome“ (SSSS) [46].

S. aureus ist ein führender Verursacher nosokomialer Infektionen, vor allem postoperativer Wundinfektionen (19,5% bis 30%) [47, 48], katheterassoziierter Bakteriämien und ventilatorassoziierter Pneumonien (20,5% bis 28%) [49-51]. Innerhalb der Bevölkerung ist *S. aureus* ferner einer der häufigsten Verursacher von Endokarditiden sowohl nativer (31,6% der Fälle) als auch künstlicher Herzklappen (23% der Fälle) [49], und Osteomyelitiden (in 50% bis 70% der Fälle) [52, 53]. Darüber hinaus stellt der Erreger hinter *Escherichia coli* den zweithäufigsten Auslöser von Bakteriämien außerhalb von Gesundheitseinrichtungen dar (15% bis 23,5%) [54, 55].

1.5 Epidemiologie

Die Keimbefestigung bei klinisch gesunden Personen wird als Kolonisation bezeichnet, der Erreger heißt dann Kommensale und die Person nennt sich Träger. Drei Trägermodelle können voneinander unterschieden werden: 1. dauerhafte Träger, 2. intermittierende Träger und 3. Nichtträger. Näherungsweise 20% der gesunden Bevölkerung sind persistierende Träger, 60% sind intermittierende Träger und 20% tragen nie *S. aureus* in ihrem Nasenvorhof [2]. Persistierende Träger behalten üblicherweise denselben Erregerstamm für eine erweiterte Zeitspanne, wohingegen intermittierende Träger dazu neigen im Verlauf der Zeit unterschiedliche Stämme zu beherbergen [3]. Solche Unterscheidungen sind wichtig, da bei permanenten Trägern die Erregerbelastung größer und das Risiko, sich mit *S. aureus* zu infizieren, erhöht ist [56].

Querschnittstudien in Populationen gesunder Erwachsener zeigten früher Kolonisierungsraten von 35% bis 50% [2]. Seit 2000 ist die weltweit einheitlich berichtete Prävalenzrate der Nasenkolonisierung mit *S. aureus* auf 25% bis 35% gesunken [57-59]. Erklärungsversuche für diesen Rückgang sind verbesserte Personalhygiene, Veränderungen in sozioökonomischen Gesellschaftsschichten und die Tendenz zu kleineren Familiengrößen [3].

Der bedeutendste Risikofaktor für eine Besiedlung mit *S. aureus* ist eine Beeinträchtigung des Immunsystems. Am deutlichsten erhöht sich das relative Risiko mit *S. aureus* kolonisiert zu werden durch die Notwendigkeit einer Dialysebehandlung (Hämodialyse (relatives Risiko (RR) 257,2), Peritonealdialyse, RR 150,0). Danach folgen andere immunsupprimierende Bedingungen wie HIV-Infektion (RR 23,7), Krebserkrankung (RR 12,9), intravenöser Drogenabusus (RR 10,1), Alkoholabusus (RR 8,2) oder Diabetes mellitus (RR 7,0) [5, 60].

Früher ging man davon aus, dass eine durch *S. aureus* bedingte Erkrankung regelhaft extrinsisch, also durch eine Infektion von außen, verursacht werde. Daher fokussierte sich die Infektionskontrolle auf die Prävention von Kreuzinfektionen zwischen Patienten untereinander [61]. Allerdings weisen mindestens drei Beobachtungen darauf hin, dass eine Infektion häufig intrinsisch erfolgt, also aus einer chronischen Besiedlung des Nasenvorhofs resultiert: 1. Kolonisierte Personen haben höhere Infektionsraten als nicht kolonisierte [2, 56]; 2. Der überwiegende Anteil der *S. aureus*-Infektionen, ob nosokomial oder nicht, hat seinen Ursprung in der patienteneigenen Flora (82% bei Bakteriämie) [4, 56, 62]; und 3. Durch Eradikation von *S. aureus* im Nasenvorhof werden eindeutig Infektionen (in Risikopatienten) reduziert [2, 63].

Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass die Kolonisierung mit *S. aureus* eine gewisse Immunität gegenüber fatalen Verläufen einer Infektion verleiht. Unter Patienten, die eine Bakteriämie entwickelten, war die Mortalität derer, die zuvor keine Träger waren, höher als bei denen, die zuvor bereits kolonisiert waren [56].

1.6 Typisierungsmethoden

Um effektive Strategien zur Prävention der Ausbreitung von *S. aureus* entwickeln zu können, ist ein genaues Verständnis seiner Epidemiologie erforderlich. Verschiedene molekulare Typisierungsmethoden wurden entwickelt, um die Verbreitung und Evolution von *S. aureus* zu erforschen [64]. Beispielsweise können einige höchst erfolgreiche Klone, die nach dem Ort benannt wurden, an dem sie zuerst beschrieben wurden, (z.B. der brasilianische, ungarische oder New York/japanische Klon) an unterschiedlichen Orten weltweit wiederentdeckt werden [65]. Die der Typisierung zu Grunde liegenden Methoden werden nachfolgend beschrieben:

1.6.1 Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE)

Die PFGE gilt als eine der meist diskriminativen Typisierungsmethoden. Sie basiert auf der Verdauung chromosomaler DNA mit dem Restriktionsenzym Sma1 und einer anschließenden Auftrennung der Fragmente mittels PFGE. Das resultierende Bandenmuster ist spezifisch für die einzelnen Klone und erlaubt eine Identifizierung der wichtigsten epidemischen Stämme [65]. Problematisch ist eine Veränderung des klonspezifischen Bandenmusters durch Akquirierung oder Verlust mobiler DNA (MGEs) und daraus resultierender Längenänderung der Chromosomfragmente. Daher eignet sich diese Methode nicht gut für Stammbaumanalysen, obwohl sie für die Verfolgung bekannter Klone extrem nützlich ist. Hohe Reproduzierbarkeit, Geschwindigkeit und niedrige Kosten wiegen den Nachteil der fehlenden standardisierten Nomenklatur und den Mangel an einer internationalen Datenbank wieder auf [64].

1.6.2 Multilokussequenztypisierung (MLST)

Im Gegensatz zur PFGE ist die Multilokussequenztypisierung eine sequenzbasierte Methode, die eine unmissverständliche phylogenetische Zuordnung eines *S. aureus*-Isolats erlaubt [66]. MLST basiert auf einer Sequenzanalyse von 7 „housekeeping“ Genen mit einer Länge von etwa 500bp. Die verschiedenen Sequenzen jedes „housekeeping“ Gens sind verschiedenen Allelen zugewiesen und jeder Erregerstamm ist definiert durch die Allele dieser 7 Gene. Die Sequenzen werden an eine zentrale Datenbank (www.mlst.net) übermittelt und mit Sequenzen anderer Isolate verglichen. Das Ergebnis ist ein Allelprofil oder Sequenztyp (ST). Organismen, die alle 7 Allele teilen, sind als Klone definiert, solche, bei denen 5 der 7 Allele identisch sind, als klonale Komplexe (CC). Der ST mit der größten Anzahl an single-locus variants (SLVs) gilt als Stammvater eines CCs [64]. Da „housekeeping“ Gene unabhängig von Antibiotikaresistenzen sind, zeichnet MLST resistente Staphylokokken gemeinsam mit ihren Antibiotika-empfindlichen Ahnen auf. Studien konnten so zeigen, dass ein paar wenige Urklone von MSSA zunächst die Welt kolonisierten und sich erst danach mit Hilfe von MGEs Antibiotikaresistenzen aneigneten [67]. Nachteile von MLST sind hohe Kosten, Aufwand und Zeitintensität [64].

1.6.3 *spA*-Typisierung

Diese single-locus Sequenzierungstechnik ist wegen ihrer einheitlichen Nomenklatur und der international zugänglichen Datenbank eine gut vergleichbare Typisierungsmethode, die durch ihre Einfachheit nicht nur Forschungslaboren vorbehalten ist, sondern durch breite Anwendung in der Routine überzeugt [68]. Dabei wird die hypervariable Region X des *S. aureus*-Protein A-Gens(*spA*) sequenziert, welche aus Wiederholungen von 24bp Länge bestehen, die durch Duplikation oder zufälligem Verlust von DNA-Material variieren können [69]. Die Trennschärfe der *spA*-Typisierung liegt zwischen der von PFGE und MLST [70]. Clusteranalysen, die auf

spA-Typisierung beruhen, sind möglich, sollten allerdings durch zusätzliche diskriminierende Marker wie z.B. *SCCmec*-Typisierung, abstammungsspezifische Gene oder spezifische Gen-Polymorphismen ergänzt werden [71, 72].

1.6.4 Microarray-Technologie

Ein relativ neues und vielversprechendes Konzept zur phylogenetischen Analyse von *S. aureus* ist die DNA-Microarraytechnologie, die anhand des Hybridisierungsmusters eine eindeutige Zuordnung von *S. aureus*-Isolaten zu (MLST-basierten) klonalen Komplexen oder *spA*-Clustern erlaubt. Diese reproduzierbare Typisierungsmethode basiert auf der Genomanalyse von *S. aureus* durch DNA-Hybridisierung an 334 unterschiedliche Gensonden einer Microarray-Platte. Dabei werden Allele 185 verschiedener Gene bestimmt, welche sich in Virulenz-, Resistenz- und speziesspezifische Gene unterscheiden lassen. Auch Stämme, die sich in MGEs unterscheiden, können mit Hilfe des Microarrays als verwandt detektiert werden. Außerdem ermöglichen die Erfassung der MGEs und einer großen Anzahl an Genen eine hohe Auflösung der Stämme innerhalb der klonalen Komplexe [73]. Nebenbei erfasst die Analyse auch *agr*-, Kapsel- und *SCCmec*-Typisierung [74, 75]. Ein hoher Durchsatz an Charakterisierungen klinischer Isolate ist zu Gesamtkosten möglich, die denen einer Multiplex-PCR vergleichbar sind, und damit ist diese Methode auch für klinische Routinelabore praktikabel [76].

Diese Microarraytechnologie hat weiterhin den einmaligen Vorteil, gleichzeitig die gesamte Pathogenitäts- und Resistenzausstattung eines klinischen Isolats zu analysieren, was einerseits von Nutzen für die Therapie sein kann und andererseits das Verständnis für den Pathomechanismus der verschiedenen *S. aureus*-Erkrankungen verbessert.

1.7 *Staphylococcus aureus* in Afrika

Nicht nur in Deutschland und anderen westlichen Ländern kommt *S. aureus* eine wichtige Bedeutung als Pathogen zu, sondern gerade in ressourcenarmen Regionen wie beispielsweise im subsaharischen Afrika spielen Staphylokokkeninfektionen eine beachtliche Rolle. Allerdings werden sie hier neben den typisch markanten Tropenkrankheiten wie Tuberkulose, Malaria und anderen Parasitosen eher vernachlässigt oder bleiben aufgrund mangelnder diagnostischer Möglichkeiten unerkannt. Dabei zeigen die hohe Säuglingssterblichkeit u.a. durch Bakteriämien [51, 77] und die Konkordanz der *S. aureus*-Infektion mit einer HIV-Infektion oder Malnutrition [77-80] deutlich die Notwendigkeit der Beachtung besonders in Afrika auf. Einige Studien zeigen, dass die Inzidenz der Bakteriämien, welche zu den fatalsten Erkrankungsentitäten der Staphylokokken gehören, in afrikanischen Ländern erhöht ist [81-84]. In westlichen Regionen liegt die Inzidenz der Bakteriämien beispielsweise bei 5-10/100.000 Einwohnern [85] im Vergleich zu Mosambik mit 425/100.000,

wovon *S. aureus* unter Neugeborenen mit 39% die häufigste Ursache darstellt [78]. Im Kontrast dazu stehen die mangelnden Kenntnisse klinischer Präsentation, Verlauf, Ausgang und Prognose der Staphylokokkenerkrankungen, sowie der pathogenen Eigenschaften der Erreger. Die Forschungsmöglichkeiten der Entwicklungsländer beschränken sich meist auf Basistechniken und die Daten sind typischerweise von einzelnen Forschungszentren erhoben, retrospektiv und ohne nennenswerte Faldefinitionen oder –dokumentationen. Mit Ausnahme von *Mykobakterium tuberculosis*, *Plasmodium* und HIV sind bisher wenige Daten über die Epidemiologie von Pathogenen dieser Region bekannt; im Speziellen nicht über die asymptomatische Trägerschaft von *S. aureus* innerhalb der gesunden menschlichen Bevölkerung [59]. Die überwiegende Anzahl an Studien über *S. aureus* in Afrika wurde in nördlicheren Ländern wie Marokko, Algerien, Tunesien oder Ägypten durchgeführt, selten jedoch im Bereich unterhalb der Sahara. Wissenschaftliche Erkenntnisse über Pathogene, die in entwickelten Ländern erhoben wurden, werden oft auf Entwicklungsländer übertragen, ohne diese vor Ort zu prüfen. Nach Herrmann et al. (2013) gehören bakterielle Infektionen, insbesondere solche, die in einer Sepsis münden können, zu den am häufigsten vernachlässigten Tropenkrankheiten und erfordern dringend weltweites Eingreifen [86]. Hohe und stetig zunehmende Resistenzraten wie Methicillin-Resistenz und sich ausbreitende Virulenzen wie PVL geben zusätzlich Anlass zur Sorge.

Um die dringend notwendige Forschung in diesem Bereich zu forcieren wurde im Jahr 2010 das „afrikanisch-deutsche StaphNet-Konsortium“ gegründet. Dies ist eine Vereinigung von drei schwarzafrikanischen und vier zentraleuropäischen (deutschen) Forschungsinstitutionen (Bagamoyo/Tansania, Lambaréné/Gabun und Manhica/Mosambik; Universitäten Münster, Freiburg und Saarland, das Fraunhofer Institut für Biomedizinische Technik in St. Ingbert) mit dem gemeinsamen Ziel Verständnis über die molekulare Phylogenie und Pathogenität von *S. aureus* in den verschiedenen geografischen Regionen zu erlangen. Diese Arbeit ist Teil des afrikanisch-deutschen StaphNet Projektes (DFG PAK296).

1.8 Zielsetzung

Erstes Ziel dieser Arbeit war die Erstellung einer *S. aureus*-Stammsammlung aus invasiven und kolonisierenden Isolaten einschließlich klinischer Hintergrundinformation und mikrobiologischer Isolateigenschaften an dem afrikanischen Standpunkt Manhica in Mosambik und an dem deutschen Standpunkt Homburg.

Durch einen Forschungsaufenthalt in Mosambik sollte zum einen durch Prozessoptimierung und aktive Unterstützung das Isolatsammeln vorangetrieben und zum anderen durch gegenseitigen Erfahrungsaustausch Kapazitäten gebildet werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Genausstattung der gesammelten Isolate aus Münster und Manhiça mittels Microarray-Technologie zu analysieren. Hierbei sollte eine epidemiologische Typisierung anhand der klonalen Komplexe erfolgen sowie die Ausstattung der *S. aureus*-Stämme mit Resistenz- und Virulenzgenen untersucht werden.

Die zentrale Zielsetzung dieser Studie bestand in der Herausarbeitung der bedeutsamen Unterschiede zwischen kolonisierenden und invasiven *S. aureus*-Isolaten sowie zwischen Isolaten aus Mosambik (Manhiça) und Deutschland (Münster).

- Gibt es landesspezifische und ubiquitär vorkommende Gene und klonale Komplexe?
- Besteht eine Assoziation zwischen einzelnen Genen oder klonalen Komplexen mit Trägerschaft oder Infektion?
- Besteht eine Korrelation zwischen bestimmten Genen und klonalen Komplexen?
- Wie vielfältig ist die Klonalität unter Kommensalen und Pathogenen in Mosambik?

2 Methodik und Material

2.1 Stammsammlung

2.1.1 Probanden/Patienten

Die Sammlung der 400 ausschließlich ambulant erworbenen *S. aureus*-Isolate fand in verschiedenen Populationen statt. Diese wurden unterschieden in gesunde Probanden, die *S. aureus* asymptomatisch als Kommensale in ihrem Nasenvorhof trugen (N=“nasal carriage“), und erkrankten Patienten mit klinisch manifester *S. aureus*-Infektion, z.B. in Form einer Pneumonie oder Wundinfektion (O=“other/nonbacteriemic infection“). Patienten mit einer Bakteriämie wurden als gesonderte Größe betrachtet (B=“bloodstream infection“).

2.1.2 Einschlusskriterien/CRF

Isolate wurden nur in die Studie aufgenommen, wenn die Personen, denen diese entnommen wurden, die zuvor vom Konsortium definierten Einschlusskriterien erfüllten. Probanden wurden nur eingeschlossen, wenn sie in den vorangegangenen vier Wochen keinen Krankenhausaufenthalt hatten und keine Antibiotika- oder Tuberkulosetherapie erhielten. Patienten wurden nur eingeschlossen, wenn ihre positive *S. aureus*-Probe innerhalb von 48 Stunden nach Aufnahme in das Krankenhaus genommen wurde, ihre Infektion also nicht nosokomial war. Die informierte Einwilligung aller Personen war Voraussetzung für die Studienteilnahme. Zu jeder Probe wurde ein Prüfbogen (CRF/“Case Report Form“) ausgefüllt, in dem neben allgemeinen und demografischen Daten zur Person auch detaillierte Hintergrundinformationen zur jeweiligen Krankengeschichte sowie die zugehörigen mikrobiologischen Isolateigenschaften erfasst wurden (siehe Anhang 8.1). Im Fall der Probanden wurden Krankengeschichte (Aufenthalte in Krankenhaus oder Pflegeeinrichtung), Komorbiditäten (darunter auch parasitäre Erkrankungen) und andere Risikofaktoren für eine *S. aureus*-Infektion, wie Drogenabusus, Fremdkörper oder HIV-Infektion, erfragt. Bezüglich der Krankheitsanamnese bediente sich der Fragebogen dem Charlson-Komorbiditäts Score und bezüglich der Prognose des Grundleidens dem McCabe-Jackson Prognose Score. Im Fall der Patienten wurden zusätzlich Informationen über die klinische Präsentation der Infektion (Lokalisation, Metastasierung bei Bakteriämie), die antibiotische Behandlung, ggf. die chirurgische Sanierung und der Krankheitsausgang nach 14 Tagen („Day 14 outcome“) erhoben.

2.1.3 Bakterienisolatsammlung

Von Oktober 2011 bis Oktober 2012 wurden im Rahmen dieser Arbeit Bakterienisolate zunächst in Homburg und anschließend in Manhiça gesammelt. Alle Isolate wurden dauerhaft in einem zentralen Stammendlager (Fraunhofer-Institut für Biomedizinische Technik (IBMT),

St. Ingbert/Deutschland) bei -200°C cryokonserviert. Die zugehörigen CRF-Bögen wurden in die zentrale Datenbank des IBMT hochgeladen.

2.1.3.1 Homburg

Die Sammlung der 200 *S. aureus*-Isolate für den Standort Homburg erfolgte in der Uniklinik und Umgebung.

Kommensalen-Isolate

Mit einem Eswab™, einem flüssigkeitsbasierten Sammel- und Transportsystem für aerobe und anaerobe Bakterien, wurden Proben von den Nasenvorhöfen gesunder Probanden entnommen und innerhalb von 48 Stunden auf 5%igem Schafblutagar ausplattiert. Nach Inkubation bei 37° C über Nacht wurde die Bakterienflora der Agarplatten mittels Phänotyp und Latextest auf *S. aureus* hin selektiert und in Reinkultur gebracht. Durch Einsatz des MALDI-TOF konnte im weiteren Schritt die *S. aureus*-Spezies bestätigt werden. Mit der Bauer-Kirby-Methode wurden Antibiotogramme für Penicillin, Cefoxitin, Tetrazyklin, Erythromycin, Clindamycin, Gentamycin, Chloramphenicol und Cotrimoxazol durchgeführt, im Fall von MRSA auch E-Tests für Cefoxitin, Clindamycin, Linezolid, Vancomycin, Daptomycin und Tigecyclin (CLSI, M100-S16, 2006); außerdem wurde auf induzierbare Clindamycin-Resistenz (D-Test) getestet.

Klinische Isolate

Die routinemäßig im mikrobiologischen Institut der Uniklinik isolierten *S. aureus*-Stämme aus Wundabstrichen, Sputum, Blutkulturen, Prothesenmaterial etc. wurden auf die Einschlusskriterien hin selektiert und die zugehörigen Patienten auf den Stationen der Klinik besucht, um die Prüfbögen auszufüllen. Dazu wurden zunächst die Patienten selbst zu persönlichen Daten und Krankengeschichte befragt, anschließend wurden den Patientenakten weitergehende Informationen zur Therapie entnommen oder ggf. von den Stationsärzten erfragt. Die mikrobiologische Testung fand in dieser Gruppe durch die Routine-Diagnostik des Instituts mittels VITEK® statt und konnte der Laborsoftware [M/Lab] entnommen werden.

2.1.3.2 Manhiça

Die Sammlung der 200 mosambikanischen *S. aureus*-Isolate fand bei den Kooperationspartnern des Centro de Investigação em Saúde de Manhiça (CISM) in dem angeschlossenen Manhiça District Hospital statt. Sie dauerte insgesamt etwa von Juni 2011 bis Januar 2013. Alle Isolate wurden vor Ort cryokonserviert und später gesammelt nach Homburg verschifft. In Homburg wurde die Spezies aller Isolate mittels MALDI-TOF überprüft bevor sie weiter in das Stammendlager nach St. Ingbert transportiert wurden.

Kommensalen-Isolate

Analog zur Sammlung in Deutschland wurden die Proben mit einem ESwab™ aus den Nasenvorhöfen der Probanden entnommen. Überwiegend fand dies in der Kinderambulanz (OPD) des angrenzenden Manhiça District Hospital statt. Hier konnten einige interessante Komorbiditäten wie Malaria, andere Parasitosen oder HIV-Infektion erfasst werden. Die mikrobiologische Testung fand im Manhiça Health Research Center statt. Die entnommenen Proben wurden noch am selben Tag auf Schafblutagar oder Kochblutagar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde von jeder Probe ein Gram-Präparat angefertigt. Nach der Inkubation wurden *S. aureus*-Kolonien mittels Latex- und Katalase-Test identifiziert und isoliert. Die Antibiogramme wurden analog zu den Homburger Kommensalen-Isolaten erstellt. Eine detaillierte Beschreibung des Sammelprozesses in Manhiça erfolgt im Ergebnisteil unter 3.1.

Klinische Isolate

Die klinischen Isolate konnten im Rahmen des normalen Krankenhausbetriebs durch Ärzte vor Ort gesammelt werden, die meisten auf der Kinderstation. Durch den Einsatz des Bactec™-Geräts konnten auch Isolate aus Blutkulturen gewonnen werden. Die Prozessierung der Proben erfolgte im Health Research Center analog zu den Kommensalen-Isolaten.

2.2 Stammanalyse

Die 400 zu analysierenden *S. aureus*-Isolate setzten sich zusammen aus je 100 kolonisierenden und 100 invasiven Isolaten pro Standort. Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwar „deutsche“ Isolate in Homburg gesammelt, Eingang in die Genanalyse fanden jedoch die Isolate des StaphNet-Kooperationspartners aus Münster, die unter identischen Bedingungen gesammelt wurden. 19 der pathogenen Isolate aus Manhiça wurden aus Blutkulturen (MM-B) isoliert und 81 aus anderen Infektionsmanifestationen (MM-O). In Münster stammten 5 Isolate aus Blutkulturen (MW-B), 95 Isolate waren anderen Infektionsursprungs (MW-O). Für die Genanalyse musste zunächst die DNA aus den *S. aureus*-Isolaten extrahiert werden. Anschließend wurde die erreichte DNA-Konzentration gemessen und die DNA mittels PCR markiert, bevor die Microarray-Analyse stattfinden konnte.

2.2.1 DNA-Extraktion und Konzentrationsmessung

Die DNA-Extraktion erfolgte entsprechend dem Protokoll des DNeasy® Blood and Tissue Kits mit spezifischen Modifikationen des Identibac® *S. aureus* Genotyping Kits. Das detaillierte Arbeitsprotokoll befindet sich im Anhang unter 8.3. Die eingefrorenen Reinkulturen der gesammelten *S. aureus*-Isolate wurden ausplattiert und über Nacht auf Schafblutagar bei 37°C inkubiert. Für die DNA-Extraktion wurde eine Impföse voll Koloniematerial, entsprechend etwa 3µl, in Lysepuffer gelöst und rüttelnd bei 37°C zur Enzymaktivierung inkubiert. Proteinase K

und ein Lysepuffer wurden hinzugegeben und die Proben bei 56°C diesmal zur Enzymdeaktivierung rüttelnd inkubiert. Nach DNA-Ausfällung durch Hinzufügen von Ethanol wurde das Lysat auf eine im Kit enthaltene Säule aufgebracht und es folgten mehrere Wasch- und Zentrifugationsschritte. Das Prinzip bestand darin, dass die DNA selektiv an die silikatische Membran der Säule bindet, während Kontaminanten und Enzyminhibitoren durch die Membran hindurch gewaschen werden. Zuletzt wurde die DNA mittels Elutionspuffer durch die Membran der Säule in ein Eppendorfgefäß eluiert und stand damit der weiteren Verwendung offen.

Um die DNA-Konzentration des Eluats zu messen wurde ein UV/Vis-Spectralphotometer (NanoDrop™) eingesetzt. Die Qualitätsgrenzen der zu verwendenden DNA lagen bei einer Konzentration von mindestens 100ng/µl und einem A_{260}/A_{280} -Quotienten von mindestens 1.8, entsprechend dem notwendigen Reinheitsgrad der DNA.

2.2.2 DNA-Markierung/-Amplifikation

Die DNA wurde in einer 96-minütigen linearen Multiplex-PCR durch Inkorporierung von Biotin-16dUTP markiert. Dabei wurde sie etwa 40-fach amplifiziert, wobei einzelsträngige PCR-Produkte entstanden, da bei der linearen PCR anstelle eines Primer-Paars nur ein einzelner Primer benutzt wird.

2.2.3 Microarray-Analyse

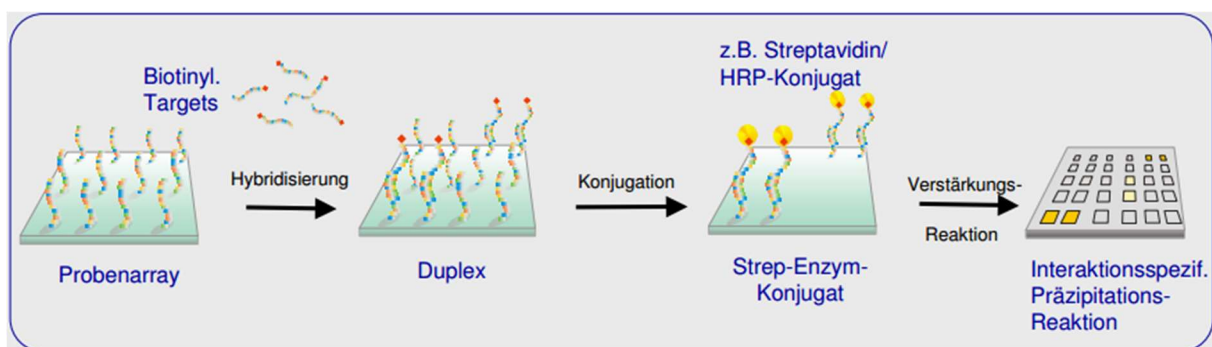


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Microarray-Prinzips [87].

Die Microarrays waren im ArrayStrip™-Format gestaltet und bestanden neben einer Anfärbungskontrolle aus 332 einzelsträngigen, Streptavidin-modifizierten Oligonukleotiden mit einer Durchschnittslänge von 28 Basen. Die zuvor vervielfältigte und Biotin-markierte einzelsträngige DNA hybridisierte an die Oligonukleotide des Microarrays. Dabei ging das Biotin im Falle einer positiven Hybridisierungsreaktion eine kovalente Bindung mit dem Streptavidin der Genspots ein. Nach stattgefundenener Hybridisierung erfolgten mehreren gründliche Waschvorgänge mit unterschiedlichen Waschpuffern. Durch Zugabe von Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase) entstand dann ein Konjugat mit dem Streptavidin, welches das nachfolgend zugegebene chromogene Substrat

SeramunGrün®chip präzipitierte und zu einer messbaren Farbreaktion führte. Eine schematische Darstellung des Microarray-Prinzips ist in Abbildung 1 dargestellt. Das detaillierte Arbeitsprotokoll befindet sich im Anhang unter 8.4.

Mithilfe des zugehörigen ArrayMate™-Lesegeräts und der zugehörigen Software Iconoclust wurden Spotsignale, die sich in unterschiedlichen Graustufen darstellten, erfasst und automatisch analysiert. Als Ergebnis der Microarraymessung von 334 Spots resultierte das korrespondierende Genprofil aus 174 verschiedenen Genen, klassifiziert in Speziesmarker, Virulenzgene, MSCRAMMs, Resistenzgene und Typisierungsmarker. Basierend auf einem eigens von dem Hersteller bereitgestellten Algorithmus wurden die Arrayprofile zudem einem spezifischen klonalen Komplex (CC) und Sequenztyp (ST) zugeordnet. Nach der Messung wurde zu jedem Isolat automatisch ein Foto des Arrays mit den angefärbten Spotsignalen im jpg-Format und ein Dokument mit dem jeweiligen Genprofil im HTML-Format erstellt. Zum Ende der Versuchsreihe wurden die Fotos aller Messungen erneut gesammelt von dem ArrayMate™-Lesegerät ausgelesen und vom Hersteller mit der aktuellsten Software-Version (2012-01-18) analysiert. Isolate, die der Hersteller keinem Sequenztyp zuordnen konnte, wurden ihm zur weiteren Analyse (MLST-Typisierung) zugesandt.

2.2.4 Statistische Auswertung

Mittels Microarray wurden insgesamt 332 Genspots detektiert, nicht alle wurden jedoch zur Analyse betrachtet. Unberücksichtigt blieben die Speziesmarker, da diese als Taxonomiemarker naturgemäß bei allen *S. aureus*-Isolaten vorhanden waren. Ebenso wurden die einzelnen Allele eines Gens nicht mit in die Analyse einbezogen, sondern nur die Gesamtwertung (z.B. *clfA* (total) als Zusammenfassung der Allele *clfA* (consensus), *clfA* (COL+RF122), *clfA* (MRSA252) und *clfA* (Mu50+MW2)). Darüber hinaus wurden verschiedene Gene, die gemeinsam für einen Phänotyp kodierten, nur als Gesamtheit betrachtet (z.B. *blaZ* stellvertretend auch für *blaI* und *blaR*; lukF-PV stellvertretend auch für lukS-PV, genannt dann PVL; *cap 8* (total) als Zusammenfassung der für verschiedene Proteine kodierenden Gene *capH8*, *capI8*, *capJ8* und *capK8*. Gene, die ein Cluster bildeten, wurden ebenfalls nicht einzeln betrachtet (*egc*-Cluster bestehend aus *seg*, *sei*, *selm*, *seln*, *selo*). Wegen Unzuverlässigkeit ausgeschlossen wurden außerdem solche Gene, die in mehr als 8,5% aller Isolate keine eindeutigen („ambiguous“) Spotsignale lieferten. Zudem wurde auf eine Analyse der SCC*mec*-Typisierung verzichtet, da das MRSA definierende *mecA*-Gen mit einer Prävalenz von 3% sowohl in Manhiça als auch in Münster sehr selten war. Auch die Typisierung der akzessorischen Genregulatoren war nicht Gegenstand der Auswertung, da diese mit nicht eindeutigen Ergebnissen des *agrI* in 20,25% der Fälle nicht reliabel war. Gene, von denen nur einzelne Loci detektiert wurden, flossen ebenso nicht in die Betrachtung ein (z.B. *hysA1* (MRSA252), *hysA1* (MRSA252+RF122) and/or *hysA2* (consensus), *hysA1*

(MRSA252+RF122) and/or hysA2 (COL+USA300)). Nach Ausschluss all dieser Gene und Genloci fanden 108 Gene Eingang in die Analyse.

In der Auswertung der klonalen Komplexe wurden die vier Isolate, die sich mittels Microarray keinem zum derzeitigen Zeitpunkt bekannten klonalen Komplex zuordnen ließen und vermutlich bisher nicht detektierte Sequenztypen (ST) darstellten, als unbekannt bezeichnet. Sie wurden nicht in die Gesamtzahl von 28 verschiedenen klonalen Komplexen eingeschlossen, allerdings in den Abbildungen als eigene Gruppe „unbekannt“ aufgeführt.

In der Verteilung der klonalen Komplexe (CCs) in spezifischen Genen (Kapitel 3.5) wurden jene CCs, die weniger als dreimal in jeder Subgruppe (MM-N, MM-OB, MW-N und MW-OB) vorkamen, wegen zu geringem Probenumfang komplett eliminiert, sodass 17 CCs zur Analyse resultierten. Kam ein Gen weniger als dreimal in einem klonalen Komplex einer Subgruppe vor wurde diese Konstellation ebenfalls aus der Analyse ausgeschlossen.

Die Daten wurden als absolute oder relative Häufigkeiten beurteilt. Signifikante Unterschiede wurden mit Hilfe des exakten Fisher-Tests ermittelt. P-Werte $\leq 0,05$ galten als signifikant, Werte $\leq 0,01$ als sehr signifikant und Werte $\leq 0,001$ als höchst signifikant. Auf eine multivariate Analyse wurde verzichtet, da die Fallzahl hierzu nicht groß genug war.

2.3 Materialnachweis

Geräte	Firma, Sitz
MALDI-TOF MS	Bruker, Billerica/USA
VITEK® 2	BioMérieux, Marcy-l'Etoile/Frankreich
Nano Drop™ 2000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen/Deutschland
ArrayMate™ Reader	Clondia Chip Technologies GmbH, Jena/Deutschland
Kits	Firma, Sitz
DNeasy® Blood & Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden/Deutschland
Identibac® S.aureus Genotyping	Alere GmbH, Köln/Deutschland
Reagenzien	Firma, Sitz
Primer	Metabion GmbH, Martinsried/Deutschland
Oligonukleotide Microarray	Metabion GmbH, Martinsried/Deutschland
SeramunGrün@chip	Seramun Diagnostica GmbH, Heidesee (Wolzig)/Deutschland
Software	Firma, Sitz
[M/Lab]	Dorner GmbH & Co. KG, Müllheim (Baden)/ Deutschland
Iconoclust (Version 2012-01-18)	Alere Technologies GmbH, Jena/Deutschland
Laborbedarf	Firma, Sitz
eSwab collection & preservation	COPAN Italia S.p.A., Brescia/Italien
Trypticase™ Soy Agar (TSA) II with 5% sheep blood - BD BBL™ Stacker™ Plates	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg/Deutschland
Pastorex™ Staph-Plus-Latex Test	Bio-Rad, Marnes-la-Coquette/Frankreich

3 Ergebnisse

Gegenstand dieser Arbeit war zunächst das Anfertigen einer *S. aureus*-Stammsammlung und daran anschließend die Analyse von 400 *S. aureus*-Isolaten. Diese konnten nach geografischer Herkunft und Besiedlungsart unterteilt werden, sodass vier Untergruppen mit je 100 Isolaten entstanden. Herkunft eines Isolats war entweder Manhiça in Mosambik (MM) oder Münster in Deutschland (MW). Die Besiedlungsart konnte kolonisierend (N) oder invasiv (OB) sein. Es resultierten die Subgruppen MM-N, MM-OB, MW-N und MW-OB zur Datenanalyse. Im ersten Ergebnisteil wurde der Forschungsaufenthalt in Mosambik und die vor Ort durchgeführten Optimierungen dargestellt. Die Analyse der mittels Microarray-Technologie erhobenen Daten der 400 *S. aureus*-Isolate fand im zweiten Teil statt. Sie erfolgte im Hinblick auf die Verteilung der klonalen Komplexe einerseits sowie der Resistenz- und Virulenzgene andererseits. Zuletzt wurde exemplarisch für einzelne Gene detailliert der Zusammenhang zwischen deren Vorkommen in den klonalen Komplexen der beiden Regionen und der Besiedlungsart betrachtet.

Zur Vollständigkeit und zum Nachschlagen befindet sich im Anhang unter 8.5 eine Übersichtstabelle der mittels Microarray detektierten Gene, die Eingang in die Analyse gefunden haben, mit ausführlicher Genbezeichnung und zugehöriger Abkürzung, wie sie in folgenden Texten, Tabellen und Abbildungen verwendet wird. Außerdem enthält die Tabelle die exakten Häufigkeiten der jeweiligen Gene in den vier o.g. Gruppen MM-N, MM-OB, MW-N und MW-OB.

3.1 Forschungsaufenthalt in Manhiça

Von August bis Oktober 2012 fand im Rahmen dieser Arbeit ein Forschungsaufenthalt in Mosambik statt, der durch das Austauschprogramm des Staphnet-Projekts realisiert werden konnte. Bei der Ankunft in Manhiça war die Sammlung der erforderlichen 100 invasiven *S. aureus*-Isolate bereits abgeschlossen. Dies war auf die Forschungsroutine der pädiatrischen Klinikärzte zurückzuführen, die beim Forschungsinstitut (CISM) angestellt waren und viele Studien betreuten. Die Zusammenarbeit mit dem Laborpersonal war eingespielt und durch den frequenten Einsatz des Bactec™-Geräts konnten auch Isolate aus Blutkulturen gewonnen werden.

Ziel des Aufenthaltes war es, die Sammelphase der kolonisierenden Isolate voranzutreiben. Zuvor wurden innerhalb von 14 Monaten 826 Nasenabstriche genommen; aus nur 35 Proben ließ sich *S. aureus* isolieren, entsprechend einer Prävalenz von 4,2%.

Zunächst wurde analysiert wo Probleme im Sammelprozess lagen und wie dieser optimiert werden konnte:

Die Nasenabstriche wurden in der pädiatrischen Ambulanz (OPD) von arbeitstechnisch voll ausgelasteten MTAs genommen. Der administrative Aufwand war sehr hoch (7 Seiten CRF, Einverständniserklärung, Laboreingangszettel und OPD-Bogen) und nur eine MTA war darin geschult, sodass pro Tag maximal fünf Proben genommen wurden. Da der englische CRF wegen der Sprachbarriere nicht vollständig verstanden wurde, wurde er nicht adäquat ausgefüllt und alle Fragen verneint. HIV-positive Kinder wurden wegen missverständlicher Anweisung nicht in die Studie eingeschlossen. Da die MTAs nicht beim Forschungsinstitut (CISM), sondern beim Krankenhaus angestellt waren, fühlten sie sich nicht für die Studie zuständig und waren ausschließlich dem Chefarzt unterstellt. Aufgrund dieser hierarchischen Strukturen und unersetzbaren Kompetenzen war es während des Aufenthaltes sehr schwierig eigene Ideen zu verwirklichen und das Projekt rasch voranzutreiben. Selbst kleine Veränderungen wurden zu einem langen Prozess. Für das Einschließen von Erwachsenen lag keine Erlaubnis vor, da der Antrag bis dato nicht gestellt worden war. Die ursprünglich geplante Feldarbeit war aus Kostengründen nicht umsetzbar. Insgesamt erschien die Bereitschaft zur Studienteilnahme bei den Bewohnern Manhiças wenig ausgeprägt, sogar bei den Mitarbeitern des Forschungszentrums.

Während des siebenwöchigen Aufenthalts konnten zumindest vorübergehend einige Optimierungen im Sammelprozess eingeführt werden. In den ersten Wochen konnte vor allem die Anzahl der Proben, die in der pädiatrischen Ambulanz genommen wurden, durch die aktive Unterstützung auf ca. 30 pro Tag erhöht werden. Um den Malariastatus sicher im CRF angeben zu können, wurde die Nummer des „dicken Tropfens“ notiert und das Ergebnis später eingeholt. Durch die Einführung von Barcodes für die CRFs, Proben, Agarplatten und Gram-Präparate konnten Übertragungsfehler verringert und Zeit gespart werden. Um das Probensammeln in der Kinderambulanz nach Ende des Aufenthaltes weiterhin zu erleichtern, wurde ein vereinfachter und gekürzter CRF in portugiesischer Sprache erstellt (im Anhang unter 8.2). HIV-positive Kinder wurden in die Studie eingeschlossen, nachdem das Missverständnis aufgedeckt war und der Chefarzt daraufhin die Anweisung dazu gegeben hatte. Außerdem wurden die CRFs in ein PDF-Formular übertragen, damit sie nicht in Handschrift eingescannt versandt wurden. Eine Woche vor der Abreise wurde die Erlaubnis erteilt Erwachsene in die Studie einzuschließen. Dazu wurden Nasenabstriche in der Erwachsenenambulanz (OPD) des Krankenhauses mit Übersetzungshilfe des MTAs genommen. Oft kannten die Probanden ihr Geburtsdatum oder -jahr, sowie ihre Nebendiagnosen nicht. Der HIV-Status war hingegen eindeutig, da meist direkt ein Schnelltest durchgeführt wurde oder bereits offensichtlich AIDS vorlag.

Die Prävalenz der Kolonisierung von *S. aureus* war mit etwa 20% in Erwachsenen ähnlich wie in Deutschland. Leider wurde nach Beendigung des Forschungsaufenthaltes aus Personalmangel nicht mit dem Probensammeln bei Erwachsenen fortgefahren.

Während der siebenwöchigen Unterstützung vor Ort konnten 33 *S. aureus*-Isolate gesammelt werden, in den folgenden drei Monaten folgten weitere 43.

Tabelle 3: Übersicht der wichtigsten Probleme, die während des Aufenthaltes in Manhica optimiert werden konnten.

Problem	Optimierung
Zu geringe Probenzahl pro Tag	Höhere Probenzahl pro Tag
<ul style="list-style-type: none"> nur eine geschulte MTA 	<ul style="list-style-type: none"> aktive Unterstützung mehrere MTAs geschult
<ul style="list-style-type: none"> CRF zu lang und englisch 	<ul style="list-style-type: none"> CRF gekürzt und portugiesisch
Niedrige Prävalenz	Höhere Prävalenz
<ul style="list-style-type: none"> Erwachsene nicht eingeschlossen 	<ul style="list-style-type: none"> Erwachsene eingeschlossen
<ul style="list-style-type: none"> HIV-positive Kinder ausgeschlossen 	<ul style="list-style-type: none"> HIV-positive Kinder eingeschlossen

Im Anschluss an den Forschungsaufenthalt in Mosambik fand im Gegenzug ein Aufenthalt eines mosambikanischen Kooperationspartners in Homburg statt, der unter anderem im Rahmen dieser Arbeit in der Microarray-Technologie angelernt wurde.

3.2 Klonale Komplexe

3.2.1 Absolute Häufigkeiten

Mithilfe des Microarrays konnten 396 der 400 *S. aureus*-Isolate eindeutig einem klonalen Komplex (CC) zugeordnet werden. Vier Isolate, davon eines aus jeder Untergruppe, ließen sich keinem zum derzeitigen Zeitpunkt bekannten klonalen Komplex zuweisen und stellten bisher nicht mittels Microarray detektierbare Sequenztypen (ST) dar („unbekannt“). Insgesamt konnten 28 verschiedene klonale Komplexe innerhalb der gesamten Studienkohorte identifiziert werden. Die Abbildung 2 stellt die klonalen Komplexe in der Reihenfolge ihrer absoluten Häufigkeit unterteilt in die vier Subkohorten MM-N, MM-OB, MW-N und MW-OB dar. Diese Reihenfolge setzt sich in den folgenden Abbildungen zur besseren Übersicht identisch fort.

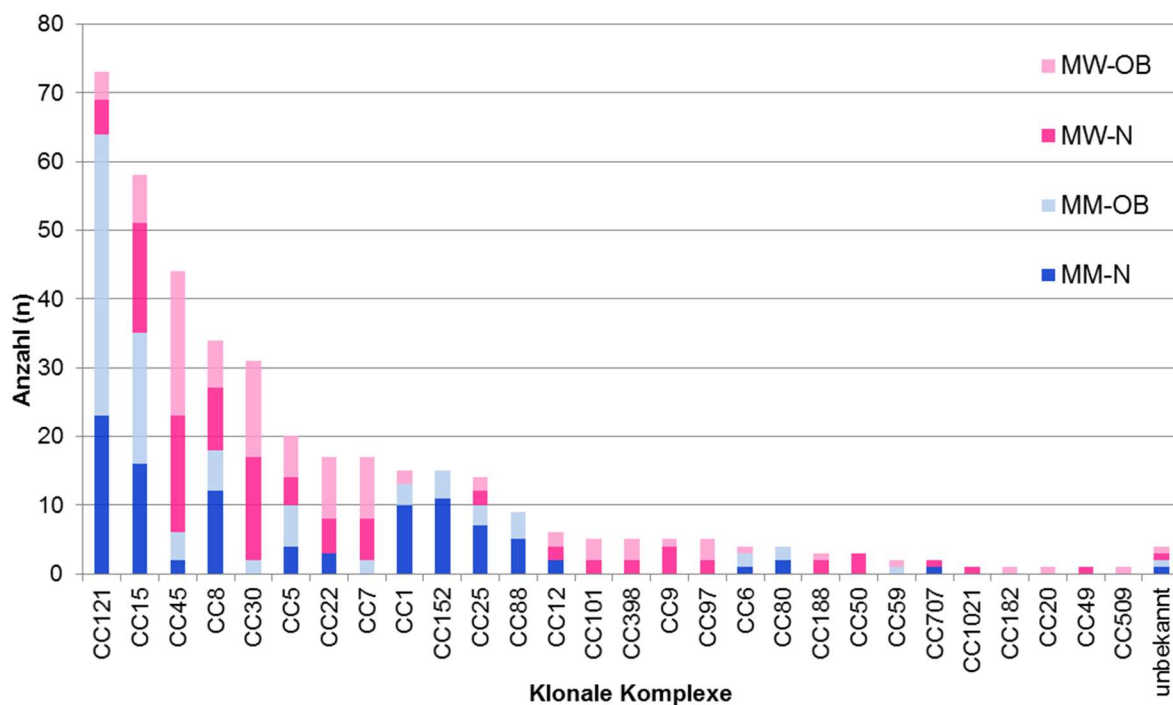


Abbildung 2: Absolute Anzahl der klonalen Komplexe mit der geografischen Unterteilung in Manhiça (MM) und Münster (MW) sowie der jeweiligen Einteilung in kolonisierende (N) und invasive (OB) Stämme.

Viele der 28 CCs kamen nur selten vor. Fünf waren nur durch ein einzelnes Isolat vertreten (CC1021, CC182, CC20, CC49, CC509) und insgesamt 15 kamen nicht öfter als fünfmal vor (zusätzlich CC101, CC398, CC9, CC97, CC6, CC80, CC180, CC50, CC59, CC707). 80% der gesamten Isolate ließen sich hingegen den zehn häufigsten CCs zuordnen (CC121, CC15, CC45, CC8, CC30, CC5, CC22, CC7, CC1, CC152). Der Großteil der Stämme beschränkte sich somit auf nur wenige verschiedene klonale Komplexe; die häufigsten vier CCs umfassten mehr als die Hälfte aller 400 Isolate (52,25%). Der häufigste klonale Komplex CC121 machte mit 73 Isolaten allein 18,25% aus. CC15 konnte in 14,5%, CC45 in 11% und CC8 in 8,5% der analysierten Stämme identifiziert werden. Nur die häufigsten fünf klonalen Komplexe erreichten insgesamt betrachtet relative Häufigkeiten über 5%.

3.2.2 Verteilung in den Regionen

Die Abbildung 3 veranschaulicht geographische Unterschiede im Vorkommen der klonalen Komplexe im mosambikanischen Manhiça und deutschen Münster ohne Unterteilung nach Besiedlungsart.

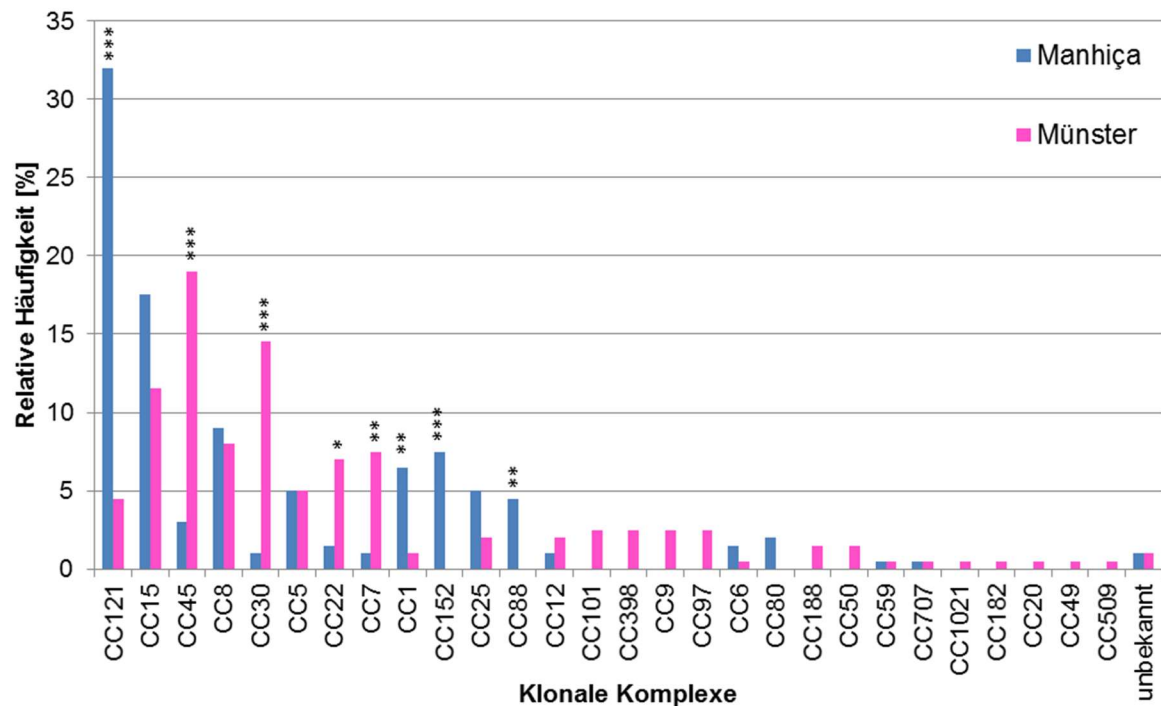


Abbildung 3: Relative Häufigkeit der einzelnen klonalen Komplexe (CC) im Vergleich zwischen den Regionen Manhiça und Münster. Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$.**

Die Diversität der klonalen Komplexe überwog in Münster. Die deutschen Isolate verteilten sich auf 25 unterschiedliche CCs, von denen 18 in weniger als je fünf Prozent der Isolate nachgewiesen werden konnten. CC45 stellte mit 19% den häufigsten klonalen Komplex in Münster dar. Am zweithäufigsten konnte CC30 in 14,5% der Isolate detektiert werden. Gemeinsam umfassten diese beiden CCs ein Drittel (33,5%) aller deutschen Isolate. Nahezu genauso viele mosambikanische Isolate (32%) ließen sich einem einzigen, dem mit Abstand am häufigsten in Manhiça vorkommenden klonalen Komplex, CC121, zuordnen. Der zweithäufigste klonale Komplex in Manhiça, CC15, erreichte eine relative Häufigkeit von 17,5%. Die beiden häufigsten CCs waren also gemeinsam in fast der Hälfte (49,5%) aller mosambikanischen Isolate zu finden. In Manhiça war die Diversität mit 17 verschiedenen klonalen Komplexen geringer ausgeprägt. 11 klonale Komplexe, die in Münster vorkamen, fanden sich nicht in Manhiça. Es gab allerdings auch drei CCs, die sich ausschließlich in Mosambik identifizieren ließen (CC152, CC88, CC80). Unter diesen zeigten CC152 (7,5%) und CC88 (4,5%) statistisch sehr signifikante Unterschiede für das größere Vorkommen in Mosambik. Signifikant häufiger in Manhiça kam außerdem CC1 mit 6,5% vs. 1% vor. Am Eindrücklichsten war der regionale Unterschied von CC121 mit 32% der Isolate aus Manhiça, aber nur 4,5% derer aus Münster. Dominanz für Münster fand sich besonders für CC45 (19% vs. 3%) und CC30 (14,5% vs. 1%) mit p -Werten $\leq 0,001$, aber auch für CC7 (7,5% vs. 1%) und CC22 (7% vs. 1,5%). CC15 als in der Gesamtpopulation am zweithäufigsten detektierte klonale Komplex kam in beiden geographischen Regionen mit 17,5% in Manhiça und 11,5%

in Münster ähnlich häufig vor. Noch gleichmäßiger verteilte sich das Vorkommen von CC8 mit 9% und 8% und CC5 mit 5% in beiden Städten.

3.2.3 Verteilung in kommensalen und invasiven Stämmen

Abbildung 4 vergleicht die mittels Microarray detektierten klonalen Komplexe im Hinblick auf ihr Vorkommen nach der Besiedlungsart, also in kommensalen und invasiven *S. aureus*-Isolaten. Dieser Vergleich wurde für die beiden Regionen Manhiça (A) und Münster (B) getrennt betrachtet.

Statistisch signifikant war genau ein Unterschied: CC121 wies mit 41% der invasiven (MM-OB) und 22,5% der kommensalen Isolate (MM-N) einen wesentlichen Trend zur Invasivität in Manhiça auf ($p \leq 0,01$) (Abbildung 4A). Klonale Komplexe, die ausschließlich in mosambikanischen Isolaten von Erkrankten detektiert wurden, waren CC30, CC7 und CC59. Nur in Kommensalen Mosambiks detektiert wurden CC22, CC12 und CC707. Die übrigen klonalen Komplexe verteilten sich recht homogen auf die Isolate beider Besiedlungsarten.

In Münster fielen keine signifikanten Unterschiede auf (Abbildung 4B). Die Verteilung der klonalen Komplexe auf die beiden Isolatquellen war homogener als in Manhiça. Insbesondere CC45 und CC30, die in Münster zahlenmäßig dominierten, waren nicht spezifisch Kommensalen oder Pathogenen zuzuordnen. Stämme des CC15 tendierten mit 16% (MW-N) vs. 7% (MW-OB) zur apathogenen Besiedlung, allerdings ergab der exakte Fisher-Test nur einen p-Wert von 0,074. Ausschließlich in infizierenden Isolaten nachzuweisen waren CC1, CC6, CC59, CC182, CC20 und CC509. Allein in kolonisierenden Isolaten konnten CC50 und CC707 nachgewiesen werden. Der in Manhiça zur Invasivität neigende CC121 wurde in Münster wiederum etwas häufiger in kolonisierenden Isolaten gefunden (5% vs. 4%).

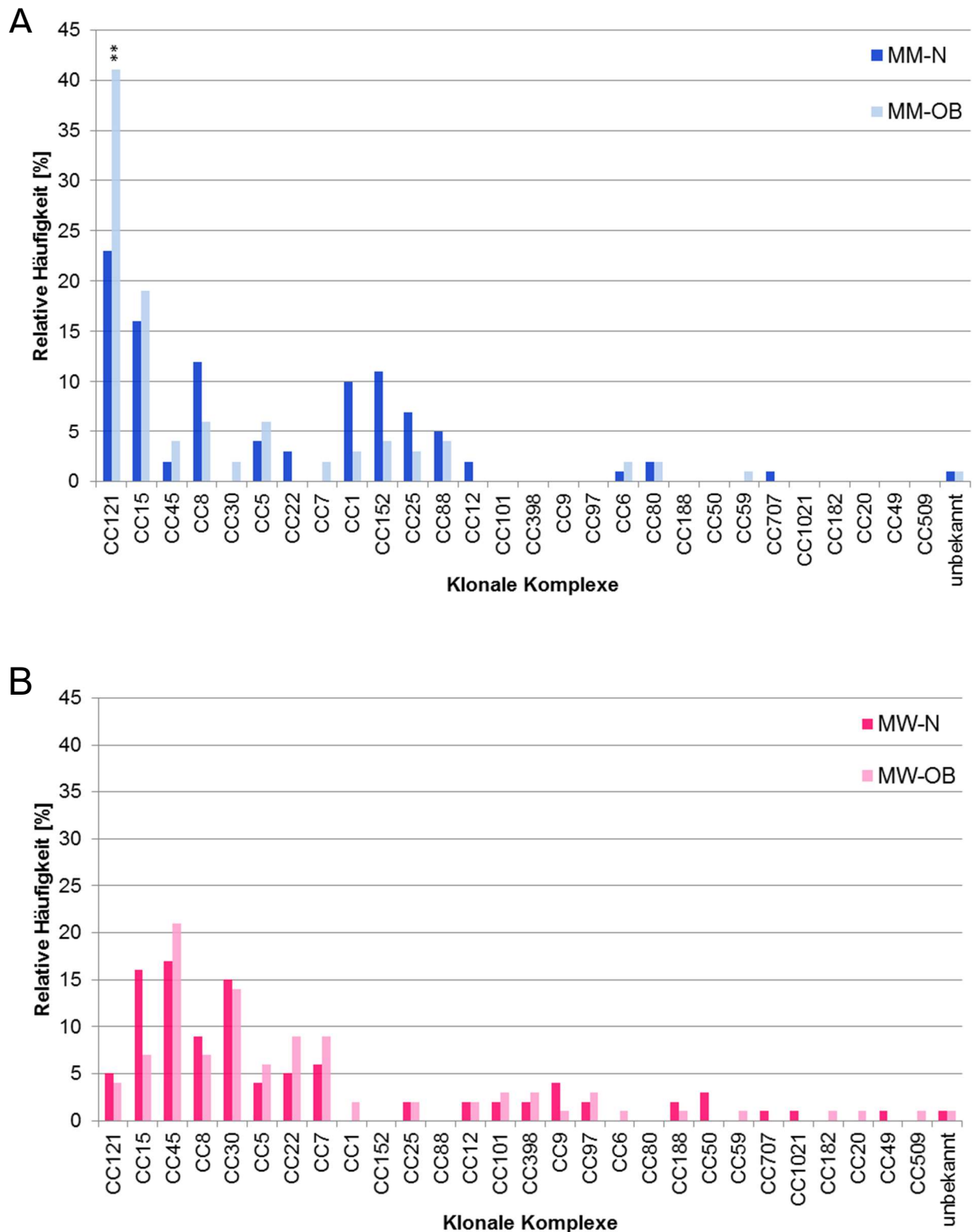


Abbildung 4: Relative Häufigkeit der einzelnen klonalen Komplexe (CC) im Vergleich zwischen kolonisierenden (N) und invasiven (OB) *S. aureus*-Isolaten unterteilt in die Regionen Manhiça (A) und Münster (B). Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: ** $p \leq 0,01$.

3.3 Resistenzgene

In der Analyse aller Microarraydaten beschränkte sich das Vorkommen von Resistenzgenen auf nur wenige Antibiotikaklassen. Zu 95% und damit am Häufigsten waren alle Isolate mit dem *sdrM*-Gen ausgestattet, welches für ein Effluxprotein kodiert. Einige Gene, wie die, die Resistenzen gegen Mupirocin (*mupA*), Vancomycin (*vanA*, *vanB*) oder Teicoplanin (*vanZ*) vermitteln, konnten im Gesamtkollektiv gar nicht detektiert werden. Andere kamen nur vereinzelt vor, wie die Aminoglykosid- (*aacA-aphD*, *aadD*, *aphA3*), Chloramphenicol- (*cat*) oder Trimethoprim-Resistenz (*dfrS1*) vermittelnden Gene. Das MRSA definierende *mecA* Gen war mit einer Prävalenz von 3% sowohl in Manhiça als auch in Münster sehr selten. Die relative Häufigkeit der im Microarray detektierten Gene für Antibiotikaresistenzen wurde zwischen Manhiça und Münster verglichen (Abbildung 5).

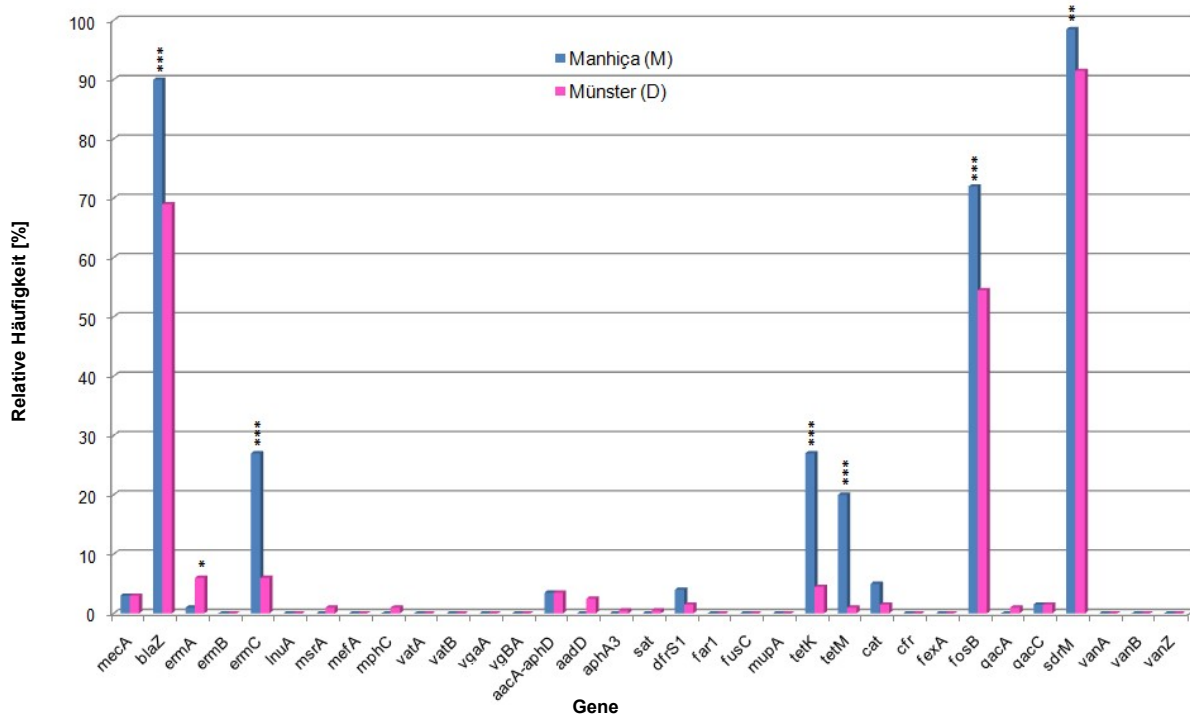


Abbildung 5: Relative Häufigkeit ausgewählter Resistenzgene der *S. aureus*-Isolate aus Manhiça und Münster im Vergleich. Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$.**

Resistenzgene wiesen in Mosambik deutlich höhere Prävalenzen auf als in Deutschland. Höchste Signifikanzen von $p \leq 0,001$ zeigten sich für die Gene (Manhiça vs. Münster), die Resistenzen gegen Betalaktame (*blaZ*: 90% vs. 69%), Erythromycin/Clindamycin (*ermC*: 27% vs. 6%), Tetrazyklin (*tetK*: 27% vs. 4,5%; *tetM*: 20% vs. 1%) und Fosfomycin (*fosB*: 72% vs. 54,5%) vermitteln. In Münster erreichten nur drei Resistenzgene eine Prävalenz von über 6% (*blaZ*, *fosB* und *sdrM*), in Manhiça dagegen sechs (zusätzlich *ermC*, *tetK* und *tetM*). Lediglich das Erythromycin-Resistenzgen *ermA* war mit einer Signifikanz von $p \leq 0,05$ prävalenter in Deutschland (6% vs. 1%).

3.4 Virulenzgene

Die Virulenzgene wurden unterschieden in klassische Toxingene, Hämolysin- und Proteasogene, Superantigen- und Enterotoxin- ähnliche Gene, Kapsel und Biofilm assoziierte Gene sowie Adhäsionsfaktorgene und MSCRAMM-Gene.

3.4.1 Klassische Toxingene

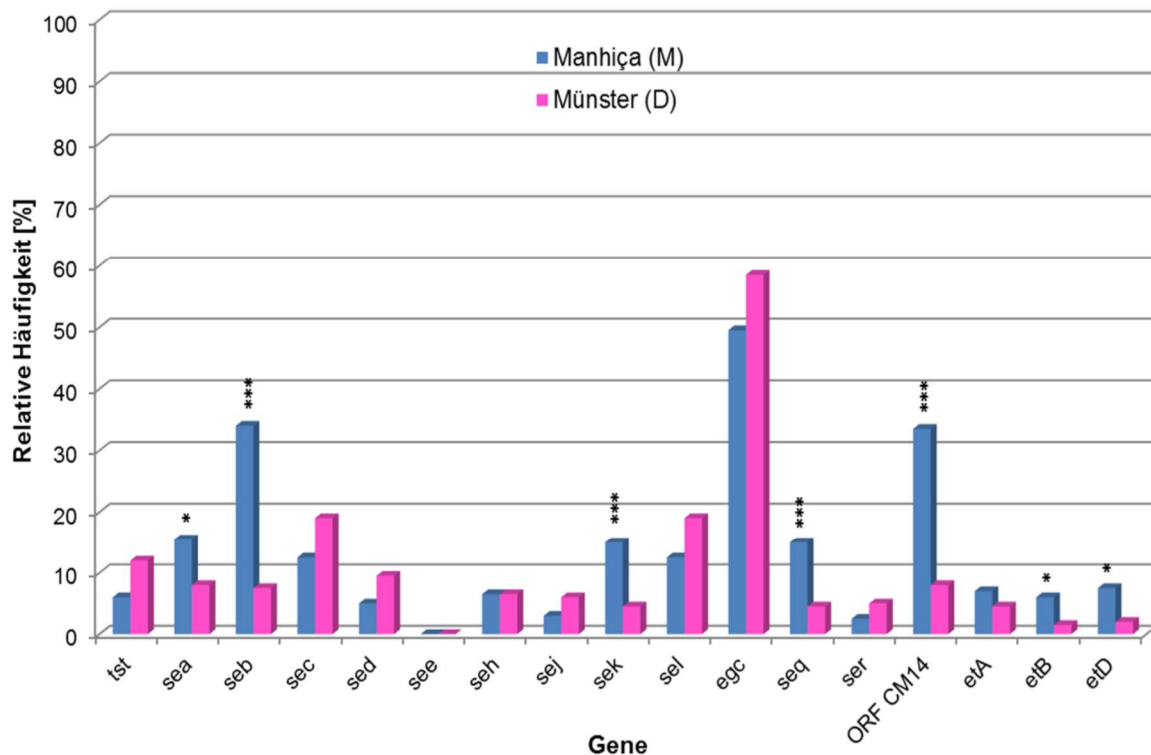


Abbildung 6: Relative Häufigkeit klassischer Toxingene der *S. aureus*-Isolate aus Manhiça und Münster im Vergleich. Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, * $p \leq 0,001$.**

Die Verteilung der klassischen Toxine innerhalb der Virulenzgene war insgesamt homogen, außer dem Enterotoxin E-Gen (*see*) kamen alle Toxingene regelmäßig vor (Abbildung 6). Nur die Gene des Enterotoxins B (*seb*), des Enterotoxin ähnlichen Proteins ORF (*ORF CM14*) und das *egc*-Gencluster erreichten Häufigkeiten über 20%. Am häufigsten innerhalb der Toxingene wurde mit 54% das *egc*-Cluster detektiert, welches aus den Enterotoxigenen *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* und *seu* besteht.

Der Vergleich beider Regionen zeigte, dass die Hälfte der Toxingene häufiger in Manhiça, die andere Hälfte häufiger in Münster vorkam. Statistisch signifikant waren die Unterschiede in den relativen Häufigkeiten nur für diejenigen Virulenzgene mit höherer Prävalenz in Manhiça. Signifikanzen von $p \leq 0,001$ fanden sich für die Enterotoxingene B (*seb*: 34% vs. 7,5%), K (*sek*: 15% vs. 4,5%), Q (*seq*: 15% vs. 4,5%), und ORF (*ORF CM14*: 33,5% vs. 8%). Die Enterotoxingene E (*see*: 0%) und H (*seh*: 6,5%) waren in beiden Regionen gleich häufig.

Das Gen des Enterotoxins D *sed* zeigte in beiden Regionen eine konträre Assoziation zu Infektion und Besiedlung (nicht in der Abbildung dargestellt). In Manhiça war *sed* mit 9% zu 1% signifikant häufiger in kommensalen Isolaten zu finden ($p \leq 0,05$), in Münster jedoch mit 3% zu 16% mehr in invasiven Isolaten ($p \leq 0,01$). Das *egc*-Cluster war in Mosambik mit 58% zu 41% prävalenter in infizierenden Stämmen ($p \leq 0,05$), für Münster fand sich kein relevanter Unterschied.

Das Toxic Shock Syndrom Toxin-Gen (*tst*) konnte doppelt so häufig in deutschen wie in mosambikanischen (12% vs. 6%) *S. aureus*-Isolaten detektiert werden, allerdings ergab der exakte Fisher Test keine statistische Signifikanz.

Die Exfoliativtoxingene (*etA*, *etB*, *etD*) kamen häufiger in den Stämmen aus Manhiça vor. Für *etB* (6% vs. 1,5%) und *etD* (7,5% vs. 2%) waren die Unterschiede signifikant ($p \leq 0,05$).

3.4.2 Hämolysin- und Proteasegene

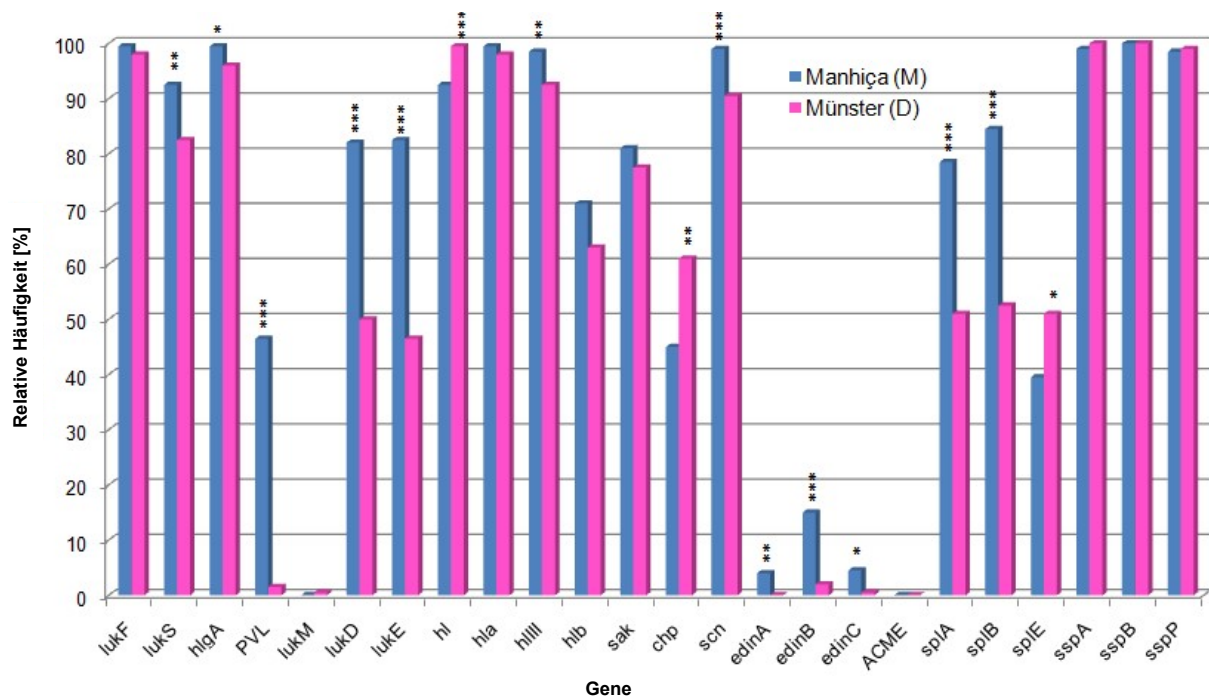


Abbildung 7: Relative Häufigkeit der Hämolysin- und Proteasegene der *S. aureus*-Isolate aus Manhiça und Münster im Vergleich. Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$.**

Die Analyse der Gene, die für Hämolysine und Proteasen kodieren, zeigten oft hohe relative Häufigkeiten. Viele Gene erreichten durchschnittliche Prävalenzen von über 50%, das Gen der Staphopain B Protease (*sspB*) sogar 100%. Der ACME Locus wurde nie detektiert und das *lukM* Gen lediglich einmal. Ein höchst signifikanter Prävalenzunterschied wurde für das putative Membranprotein Gen (*hl*) mit einer relativen Häufigkeit von 99,5% in den *S. aureus*-Stämmen aus Münster und in 92,5% in denen aus Manhiça detektiert. Des Weiteren kamen die Gene, die für das Chemotaxis inhibierende Protein (CHIPS) (*chp*: 61% vs. 45%) und die

Serin Protease E (*spIE*: 51% vs. 39,5%) kodieren, signifikant häufiger in Münster vor. Vier Mal häufiger waren erneut die Gene, die in Manhiça signifikant höhere Prävalenzen bildeten. Darunter fielen die Gene der Hämolyse (*hlgA*, *hla*, *hly*), Leukozidine (*luk*), Staphylokinase (*sak*) und des Staphylokokken Komplement Inhibitor (*scn*). Einen höchst signifikanten Unterschied mit einem p-Wert von $\leq 0,001$ gab es für das Panton Valentine Leukocidin-Gen (PVL) mit einer relativen Häufigkeit von 46,5% innerhalb der Stämme aus Mosambik und 1,5% innerhalb derer aus Deutschland. Für kein weiteres Gen konnte ein so deutlicher Unterschied erfasst werden. Bei den Genen der verschiedenen Serin Proteasen (*spIA*, *B*, *E*) fiel auf, dass die deutschen Isolate konstant zu etwa 50% mit allen drei Genen ausgestattet waren, wohingegen die mosambikanischen Isolate eine sehr inhomogene Verteilung aufwiesen. Das Gen der Serin Protease E (*spIE*) war dort mit 39,5% etwa halb so oft vorhanden wie das der Serin Proteasen A (*spIA*: 78,5%) und B (*spIB*: 84,5%). Die Gene der Inhibitoren der Epidermalzelldifferenzierung (*edin A*, *B* und *C*) waren mit 0% bis 2% relativer Häufigkeit innerhalb der *S. aureus*-Stämme aus Münster sehr selten, sodass diese Gene mit 4% bis 15% relativer Häufigkeit signifikant häufiger in Manhiça vorkamen.

3.4.3 Superantigen- und Enterotoxin- ähnliche Gene

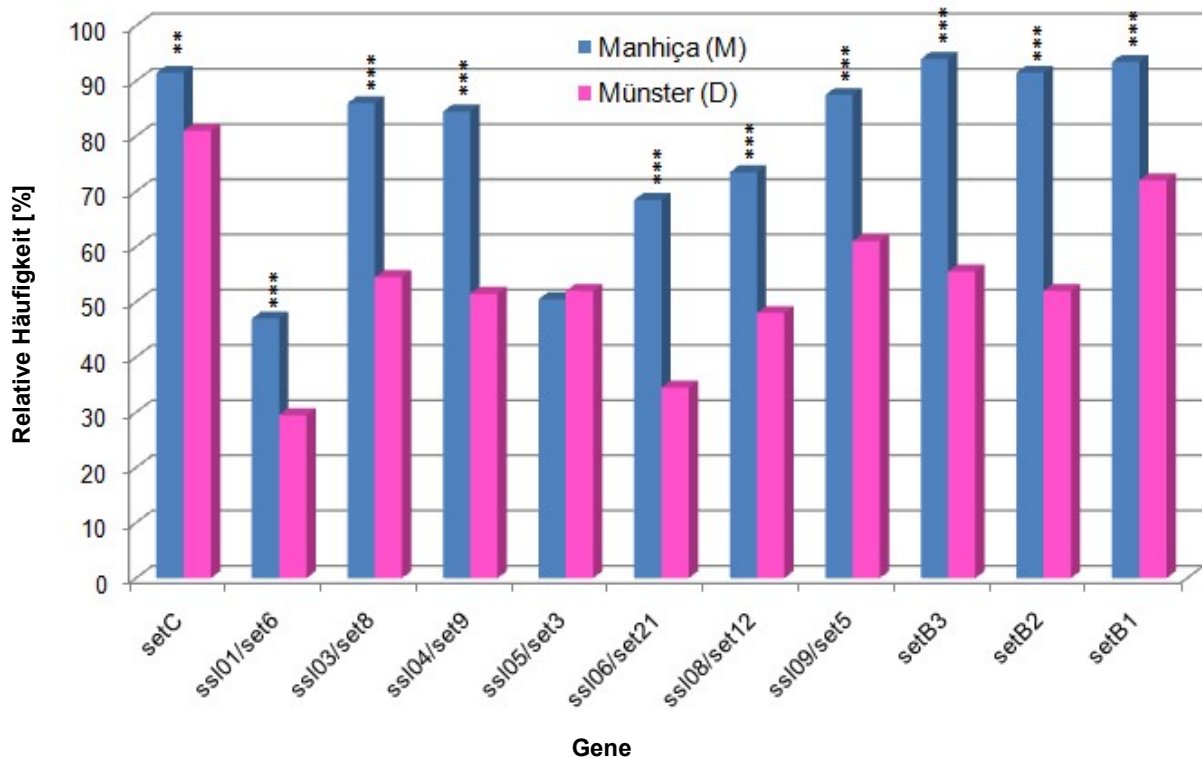


Abbildung 8: Relative Häufigkeit der Superantigen- und Enterotoxin- ähnlichen Gene der *S. aureus*-Isolate aus Manhiça und Münster im Vergleich. Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$.**

In der Microarray-Analyse stellten Superantigen- und Enterotoxin- ähnlichen Gene eine weitere Untergruppe der Virulenzgene dar. Ließ man *setC* und *ssa105/set3* außer Betracht,

verliefen die die relative Häufigkeit widerspiegelnden Säulen der Abbildung 8 für Manhiça und Münster nahezu parallel. Die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Gene untereinander war in beiden Regionen ähnlich, doch mit einer um mindestens 21,5 Prozentpunkte erhöhten relativen Häufigkeit dieser Gene in Mosambik. Der Unterschied in der Prävalenz war höchst signifikant ($p \leq 0,001$). Für das Staphylokokken Exotoxin-ähnliche Protein-Gen (*setC*) betrug die Signifikanz $p \leq 0,01$. Als einzige Ausnahme innerhalb der Gruppe der Superantigene und Enterotoxine war das Staphylokokken Superantigen-ähnliche Protein 5-Gen (*ssl05/set3*) häufiger in deutschen *S. aureus*-Stämmen vertreten, allerdings ohne statistische Signifikanz.

3.4.4 Kapsel und Biofilm assoziierte Gene

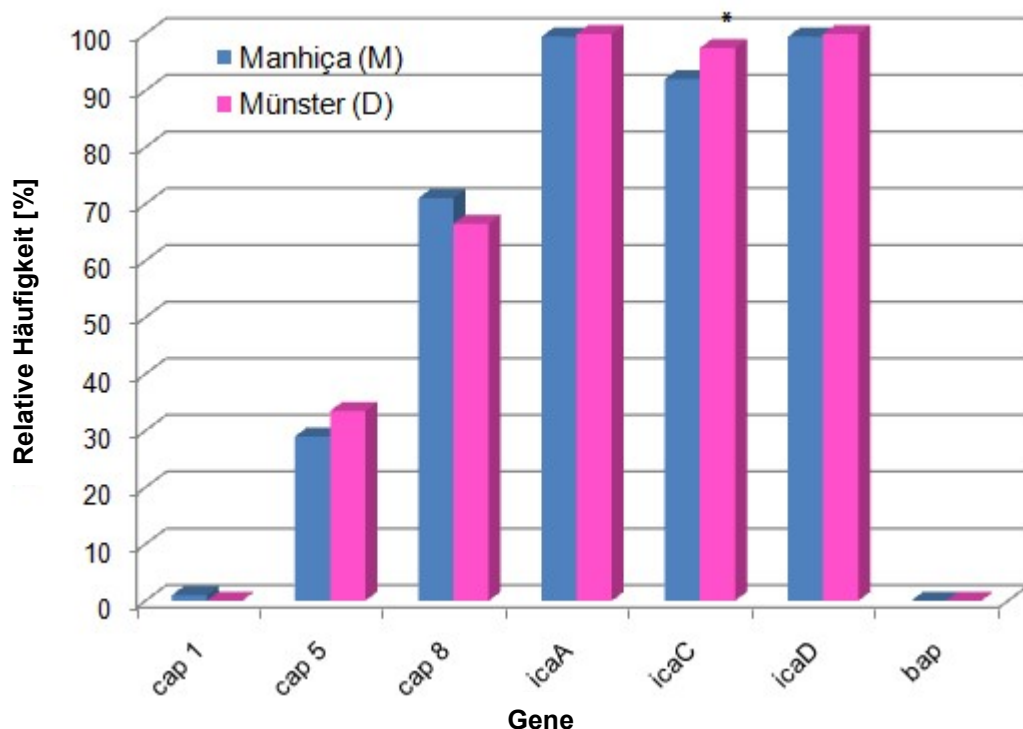


Abbildung 9: Relative Häufigkeit der Kapsel und Biofilm assoziierten Gene der *S. aureus*-Isolate aus Manhiça und Münster im Vergleich. Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: * $p \leq 0,05$.

Die Kapsel und Biofilm assoziierten Gene verteilten sich unabhängig von der Region sehr ähnlich auf die analysierten Isolate (Abbildung 9). Mit nahezu 70% stellte das Typ 8 Gen (*cap 8*) den häufigsten Kapseltyp dar. Nicht einmal halb so oft wurde das Gen des Kapseltyps 5 (*cap 5*) mit durchschnittlich ca. 30% detektiert. Auffällig war, dass die relativen Häufigkeiten der Kapseltyp 5 und 8 Gene sich gemeinsam zu etwa 100% addierten. Das Kapseltyp 1 Gen (*cap 1*) fand sich nur in zwei mosambikanischen Isolaten und war damit vernachlässigbar selten. Die Gene der interzellulären Adhäsionsproteine A und C (*icaA*, *icaC*) und des Biofilm PIA synthetisierenden Proteins D (*icaD*) waren in über 90% aller Isolate vorhanden; *icaC* signifikant häufiger in Stämmen aus Münster (97,5% vs. 92%). Das in die Biofilm-Formation involvierte Oberflächenprotein-Gen *bap* konnte in keinem der 400 Isolate nachgewiesen werden.

3.4.5 Adhäsionsfaktor/MSCRAMM-Gene

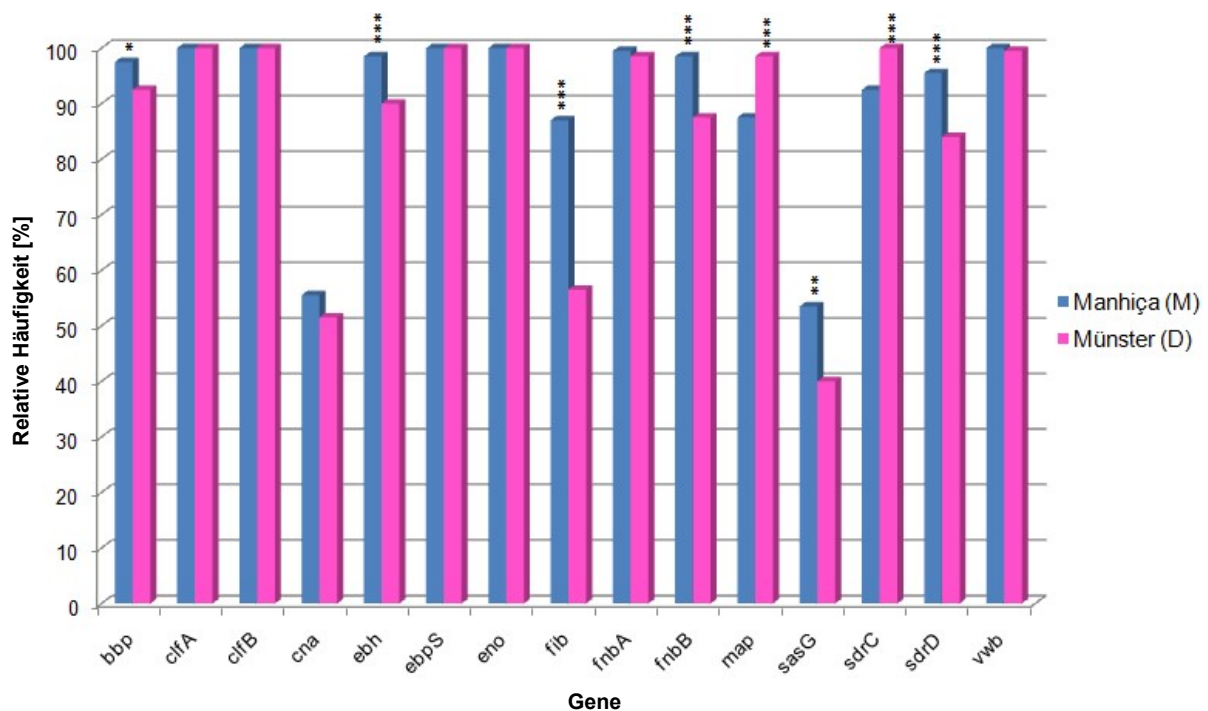


Abbildung 10: Relative Häufigkeit der Gene für Adhäsionsfaktoren und MSCRAMMs der *S. aureus*-Isolate aus Manhiça und Münster im Vergleich. Die statistische Auswertung erfolgte mittels exaktem Fisher-Test: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, * $p \leq 0,001$.**

Es zeigte sich eine annähernd vollständige Ausstattung aller analysierten *S. aureus*-Isolate mit den Genen, die für Adhäsionsfaktoren und MSCRAMMs (microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) kodieren (Abbildung 10). Die Gene der Clumping-Faktoren A und B (*clfA*, *clfB*), des Zelloberflächen-Elastin bindenden Proteins (*ebpS*) und der Enolase (*eno*) kamen zu 100% vor, die des Fibronektin bindenden Proteins A (*fnbA*) und des van Willebrand Faktor bindenden Proteins (*vwb*) in 399 der 400 Isolate. Nur drei Gene erreichten keine relative Häufigkeit von durchschnittlich über 85%. Diese waren die des Kollagen-bindenden Adhäsins (*cna*: 58%), des Fibrinogen bindenden Proteins (*fib*: 71,75%) und des *S. aureus* Oberflächenproteins G (*sasG*: 46,75%). Trotz der hohen Genprävalenzen zeigten sich deutlich signifikante Unterschiede ($p \leq 0,001$) zwischen Manhiça und Münster. In Manhiça dominierten die Gene des Zellwand assoziierten Fibronektin bindenden Proteins (*ebh*), des Fibrinogen bindenden Proteins (*fib*: 87% vs. 56,5%), des Fibronektin bindenden Proteins B (*fnbB*) und des Serin-Aspartat reichen Fibrinogen-/Knochen Sialoprotein bindenden Proteins D (*sdrD*). Das Gen des Serin-Aspartat reichen Fibrinogen-/Knochen Sialoprotein bindenden Proteins C (*sdrC*) hingegen dominierte in Münster, ebenso das des extrazellulären Adhärenzproteins (*map*).

3.5 Detaillierte Verteilung der klonalen Komplexe in ausgewählten Genen

Um im Detail den Zusammenhang zwischen einem Gen und seinem Vorkommen in den einzelnen klonalen Komplexen, den beiden geografischen Regionen und der Besiedlungsart

zu analysieren wurden exemplarisch zehn prägnante Gene ausgewählt. Die Darstellung der Analyse erfolgte tabellarisch. Hierbei wurde die bekannte Reihenfolge der klonalen Komplexe beibehalten, allerdings jene CCs, die in keiner Subgruppe mehr als zweimal vorkamen, zwecks besserer Übersicht und mangelnder Aussagefähigkeit eliminiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Jede Tabelle wurde neben den 17 verbliebenen CCs in die vier Subgruppen MM-N, MM-OB, MW-N und MW-OB aufgegliedert. Ein Tabellenfeld zeigt die relative Häufigkeit des betreffenden Gens in einem klonalen Komplex einer Subgruppe. Das erste Tabellenfeld der Tabelle 4 sagt somit aus, dass 100% der dem CC121 zugehörigen kommensalen Isolate aus Manhiça mit dem Betalaktamase-Resistenzgen ausgestattet waren. Zusätzlich wurden die relativen Häufigkeiten mit einer Farbskala verdeutlicht.

3.5.1 Resistenzgene

Für die Antibiotikaresistenzen wurden exemplarisch die Gene der Betalaktamase-, Erythromycin-/Clindamycin-, Tetrazyklin- und Fosfomycin-Resistenz analysiert.

Tabelle 4: Relative Häufigkeit des Betalaktamase-Resistenzgens *blaZ* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>blaZ</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	100%	98%	100%	100%
CC15	94%	100%	75%	86%
CC45	ag	50%	65%	57%
CC8	92%	100%	67%	71%
CC30	nn	ag	87%	93%
CC5	100%	100%	0%	50%
CC22	100%	nn	40%	89%
CC7	nn	ag	50%	67%
CC1	90%	100%	nn	ag
CC152	73%	75%	nn	nn
CC25	86%	100%	ag	ag
CC88	80%	100%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	33%
CC398	nn	nn	ag	67%
CC9	nn	nn	100%	ag
CC97	nn	nn	ag	67%
CC50	nn	nn	0%	nn
gesamt	89%	91%	66%	72%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Das Betalaktamaseresistenz vermittelnde Gen *blaZ* war in 25 der 28 klonalen Komplexe nachzuweisen (nicht in CC50, CC59, CC80). Dabei betrug die relative Häufigkeit nahezu durchgehend 50% und mehr in den einzelnen Subgruppen. Wie bereits gezeigt, wurde *blaZ* signifikant häufiger in mosambikanischen Isolaten detektiert (90% vs. 69%). Die Farbgebung

dieser Darstellung macht deutlich, dass auch die einzelnen klonalen Komplexe der mosambikanischen Isolate zu 73% bis 100% mit dem *blaZ* Gen ausgestattet waren. Einzige Ausnahme hiervon war der überwiegend in Deutschland vorkommende CC45 mit nur 50%. Darüber hinaus fiel auf, dass das *blaZ* Gen innerhalb eines klonalen Komplexes sowohl in Manhiça als auch in Münster jeweils häufiger in invasiven Isolaten nachgewiesen werden konnte als in kolonisierenden (ausgenommen CC121 und CC45). Dieser Unterschied stellte sich jedoch als nicht signifikant heraus (MM: $p=0.8143$, MW: $p=0.4447$). Besonders hervorstechend war der überwiegend mosambikanische CC121 mit einer annähernd 100%igen Durchsetzung mit *blaZ* unabhängig von Region oder Besiedlungsart. Interessanterweise war der in Manhiça isoliert gefundene CC152 nur zu durchschnittlich 74% mit dem *blaZ* Gen ausgestattet. Der CC9 als ausschließlich in Münster gefundener klonaler Komplex erreichte dagegen eine 100%ige Ausstattung mit *blaZ*. Eine sehr ungewöhnliche Verteilung wies das *blaZ* Gen im CC5, der in beiden Regionen gleich häufig vorkam, auf. Es war in allen Isolaten aus Manhiça vorhanden, in der Hälfte aller invasiven Isolate aus Münster, aber in keinem der kommensalen Isolate aus Münster.

Als weiteres Gen aus der Klasse der Antibiotikaresistenzen wurde das der Erythromycin-/Clindamycinresistenz ausgewählte, welches ebenfalls vermehrt in Mosambik vorkam. Beim ersten Anblick der Tabelle 5 fiel auf, dass sich das *ermC* Gen recht homogen über die klonalen Komplexe verteilte. Es kam in vielen CCs vor, in keinem jedoch besonders häufig. Auch eine Tendenz des *ermC* Gens zu kommensalen oder invasiven Isolaten konnte nicht ausgemacht werden. Es fiel allerdings auf, dass die klonalen Komplexe der mosambikanischen Isolate zu höheren prozentualen Anteilen mit dem Gen ausgestattet waren als die deutschen. Der überwiegend in Manhiça detektierte CC1 hatte mit 80% der kommensalen und 67% der invasiven Isolate am meisten Makrolidresistenz inne. In Münster hingegen erreichte kein klonaler Komplex in einer Subgruppe mehr als 33%. Der klonale Hauptkomplex Münsters CC45 war einer von drei CCs, die in einer Untergruppe Manhiças kein *ermC* Gen enthielten und auch in Münsters invasiven Isolaten nur 10% erreichte. Der zweithäufigste deutsche klonale Komplex, CC30, trug weder in den Pathogenen noch in den Kommensalen das *ermC* Gen.

Tabelle 5: Relative Häufigkeit des Makrolid-Resistenzgens *ermC* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>ermC</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	43%	24%	0%	25%
CC15	6%	21%	6%	14%
CC45	ag	0%	0%	10%
CC8	33%	50%	0%	14%
CC30	nn	ag	0%	0%
CC5	0%	17%	25%	0%
CC22	33%	nn	0%	11%
CC7	nn	ag	17%	0%
CC1	80%	67%	nn	ag
CC152	18%	25%	nn	nn
CC25	57%	0%	ag	ag
CC88	20%	25%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	33%
CC398	nn	nn	ag	0%
CC9	nn	nn	25%	ag
CC97	nn	nn	ag	0%
CC50	nn	nn	33%	nn
gesamt	32%	22%	5%	7%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Tabelle 6: Relative Häufigkeit des Tetrazyklin-Resistenzgens *tetK* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>tetK</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	17%	7%	0%	25%
CC15	44%	42%	13%	14%
CC45	ag	0%	0%	0%
CC8	50%	17%	0%	0%
CC30	nn	ag	0%	0%
CC5	25%	17%	0%	0%
CC22	0%	nn	0%	0%
CC7	nn	ag	17%	0%
CC1	20%	67%	nn	ag
CC152	55%	50%	nn	nn
CC25	29%	0%	ag	ag
CC88	80%	100%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	0%
CC398	nn	nn	ag	67%
CC9	nn	nn	0%	ag
CC97	nn	nn	ag	33%
CC50	nn	nn	0%	nn
gesamt	33%	21%	4%	5%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

In Tabelle 6 wurde das Tetrazyklin-Resistenzgen *tetK* analysiert, welches wiederum häufiger in *S. aureus*-Stämmen aus Manhiça anzutreffen war. In 16 der zusammen 28 CCs war es gar nicht nachzuweisen. Darunter waren sowohl die überwiegend deutschen CC45 und CC30, die ausschließlich deutschen CC101 und CC9 und der nur in Kommensalen detektierte CC50. Unter den Isolaten aus Münster waren insgesamt nur 6 klonale Komplexe mit dem *tetK* Gen ausgestattet. Die isoliert in Mosambik detektierten Isolate des CC88 enthielten im Durchschnitt zu 90% und damit mit Abstand am häufigsten das Tetrazyklin-Resistenzgen. Darauf folgte der ebenfalls nur in Mosambik angetroffene CC152 mit etwas über 50%. Insbesondere der häufigste klonale Komplex, CC121, der statistisch signifikant häufiger in Isolaten aus Manhiça und Erkrankten vorkam, schien keine besondere Affinität zur Tetrazyklinresistenz zu haben. Eine Tendenz zur Invasivität oder Kommensalismus ließ sich für das *tetK* Gen nicht ausmachen.

Tabelle 7: Relative Häufigkeit des Fosfomycin-Resistenzgens *fosB* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>fosB</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	96%	100%	100%	100%
CC15	100%	100%	100%	100%
CC45	ag	0%	0%	0%
CC8	100%	100%	100%	100%
CC30	nn	ag	100%	100%
CC5	100%	100%	100%	100%
CC22	0%	nn	0%	0%
CC7	nn	ag	0%	0%
CC1	0%	0%	nn	ag
CC152	0%	0%	nn	nn
CC25	100%	100%	ag	ag
CC88	0%	0%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	100%
CC398	nn	nn	ag	0%
CC9	nn	nn	100%	ag
CC97	nn	nn	ag	33%
CC50	nn	nn	0%	nn
gesamt	65%	79%	59%	50%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Als letztes Gen aus der Klasse der Antibiotikaresistenzen wurde das Fosfomycin-Resistenzgen ausgewählt. Dieses Gen wurde in Manhiça mit 79% zu 65% signifikant häufiger in infizierenden als in kolonisierenden Isolaten detektiert ($p \leq 0,05$). Dieses Verhältnis konnte interessanterweise für Münster nicht bestätigt werden, hier verhielt es sich andersherum (50% vs. 59%). Betrachtete man die Tabelle 7 fiel auf, dass das *fosB* Gen entweder zu 100% in einem klonalen Komplex vorhanden war oder überhaupt nicht, abgesehen von zwei Ausnahmen (CC121 und CC97). Dieses Vorhanden- oder Nichtvorhandensein des *fosB* Gens

war innerhalb eines klonalen Komplexes unabhängig von Herkunft oder Besiedlungsart der Isolate. In Isolaten aus 15 der 28 CCs wurde überhaupt kein *fosB* Gen gefunden. Bemerkenswert war, dass die überwiegend deutschen CC45, CC22 und CC7 das *fosB* Gen nicht trugen, die ebenfalls häufig in Münster vorkommenden CC30 und CC15 jedoch zu 100%. Dafür trugen die mosambikanischen CC1, CC152 und CC88 das *fosB* Gen wiederum nicht.

Zusammenfassend ließen sich Gemeinsamkeiten und Unterschiede der *S. aureus*-Isolate der einzelnen klonalen Komplexe bezüglich der Genausstattung mit Resistenzfaktoren feststellen. Überregional und unabhängig von der Besiedlungsart am ähnlichsten waren die Isolate des CC45. Dieser beinhaltete ausschließlich die Betalaktamaseresistenz. Regional am unterschiedlichsten waren die klonalen Komplexe CC15, CC8 und CC5 mit durchgehend größerer Resistenzgen-Ausstattung der Isolate aus Manhiça. Der isoliert mosambikanische CC152 und überwiegend deutsche CC30 waren am ausgewogensten zwischen kommensalen und invasiven Isolaten mit Resistenzgenen ausgestattet. *tetK* zeigte eine Korrelation zu CC88 und *ermC* zu CC1. Das Fosfomycin-Resistenzgen *fosB* war hoch klonal.

3.5.2 Virulenzgene

Exemplarisch für die Virulenzfaktoren wurden die Gene des Enterotoxins B, des *egc*-Clusters, des Pantone Valentine Leukozidins, des *S. aureus*-Oberflächenproteins G sowie der Kapseltypen 5 und 8 analysiert.

Insgesamt 50 der 83 Isolate (60%), die das Enterotoxin B-Gen in ihrem Genom trugen, gehörten dem CC121 an, 11 (13%) dem CC8. Die anderen *seb*-positiven Isolate verteilten sich recht homogen auf die anderen klonalen Komplexe. Mit einem p-Wert von $\leq 0,001$ enthielten die dem CC121 zugehörigen Stämme aus Manhiça häufiger das *seb* Gen als jene aus Münster (77% vs. 11%) (Tabelle 7). Mit 41% zu 27% war *seb* in Manhiça unabhängig von klonalen Komplexen mehr in invasiven als kommensalen Isolate detektierbar ($p=0,05$). In Münster war die Verteilung hingegen homogen. Nur vier deutsche der dargestellten 12 klonalen Komplexe enthielten das *seb* Gen und es konnte in keinem CC häufiger als zu 29% detektiert werden. Die zahlenmäßig dominanten CC15, CC45 und CC30 trugen nie das Gen des Enterotoxins B. Allerdings waren die Isolate des CC8 durchgehend in allen Subgruppen mit diesem Gen ausgestattet. Der CC5, welcher in beiden Regionen ähnlich häufig vorkam, wies auch in drei der vier Subgruppen das *seb* Gen auf.

Tabelle 8: Relative Häufigkeit des Enterotoxin B Gens *seb* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>seb</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	78%	76%	0%	25%
CC15	0%	0%	0%	0%
CC45	ag	0%	0%	0%
CC8	42%	33%	22%	29%
CC30	nn	ag	0%	0%
CC5	25%	50%	0%	17%
CC22	0%	nn	0%	0%
CC7	nn	ag	0%	0%
CC1	0%	33%	nn	ag
CC152	0%	0%	nn	nn
CC25	0%	67%	ag	ag
CC88	0%	0%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	0%
CC398	nn	nn	ag	0%
CC9	nn	nn	25%	ag
CC97	nn	nn	ag	0%
CC50	nn	nn	0%	nn
gesamt	27%	41%	6%	9%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Tabelle 9: Relative Häufigkeit des *egc*-Genclusters in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>egc</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	100%	100%	100%	100%
CC15	0%	0%	0%	0%
CC45	ag	100%	100%	100%
CC8	17%	33%	0%	0%
CC30	nn	ag	100%	100%
CC5	100%	100%	100%	100%
CC22	100%	nn	100%	100%
CC7	nn	ag	0%	0%
CC1	0%	0%	nn	ag
CC152	0%	0%	nn	nn
CC25	100%	100%	ag	ag
CC88	0%	0%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	0%
CC398	nn	nn	ag	0%
CC9	nn	nn	100%	ag
CC97	nn	nn	ag	0%
CC50	nn	nn	100%	nn
gesamt	41%	58%	56%	61%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Die Tabelle 9 zeigt eindrucksvoll, dass entweder alle Isolate innerhalb eines klonalen Komplexes das Enterotoxin *egc*-Cluster in ihrem Genom trugen oder gar keine, mit Ausnahme des CC8 (17% und 33%). Dieser Sachverhalt war unabhängig von regionaler Herkunft oder Besiedlungsart eines Isolats. Im Gesamtkollektiv war das *egc*-Gencluster häufiger in Münster zu finden. Auffällig war, dass CC45, CC30 und CC22 hier ausnahmsweise zu 100% positiv für ein Gen waren. Mit einem p-Wert von $\leq 0,05$ zeigte sich unabhängig der klonalen Komplexe ein Trend zur Invasivität der Isolate in Mosambik, die mit dem Enterotoxincluster ausgestattet waren (41% vs. 58%). Es bestand kein Zusammenhang zwischen den Enterotoxingenen *seb* und dem *egc*-Cluster bezüglich der Verteilung auf die einzelnen klonalen Komplexe.

Tabelle 10: Relative Häufigkeit des Panton Valentine Leukozidin Gens PVL in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

PVL	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	78%	85%	0%	50%
CC15	0%	5%	0%	0%
CC45	ag	0%	0%	0%
CC8	0%	0%	0%	0%
CC30	nn	ag	0%	0%
CC5	25%	83%	0%	0%
CC22	100%	nn	0%	0%
CC7	nn	ag	0%	0%
CC1	20%	33%	nn	ag
CC152	91%	100%	nn	nn
CC25	29%	100%	ag	ag
CC88	60%	100%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	0%
CC398	nn	nn	ag	0%
CC9	nn	nn	0%	ag
CC97	nn	nn	ag	0%
CC50	nn	nn	0%	nn
gesamt	39%	54%	0%	3%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Das Gen des Panton Valentin Leukocidins wurde als signifikanteste Auffälligkeit aus der Gruppe der Hämolyisin- und Proteasegene ausgewählt. Neben dem CC121 mit zwei PVL-positiven invasiven Isolaten aus Münster wurde in einem weiteren invasiven deutschen Isolat des CC1, der wegen zu geringer Anzahl nicht in der Tabelle aufgeführt wurde, PVL nachgewiesen. Abgesehen von diesen beiden CCs konnte in keinem weiteren CC in Münster PVL detektiert werden. Insgesamt war nur in Isolat aus neun der 28 verschiedenen detektierten CCs das PVL Gen zu finden. Mit 55 der 96 Isolate, die das PVL Gen trugen, gehörten 57% dem CC121 an. Weiterhin waren Stämme, die den klonalen Komplexen CC152, CC25 und CC88 angehörten, überwiegend PVL-positiv. Der CC152 war mit 93% am deutlichsten von allen klonalen Komplexen mit PVL assoziiert. Der überwiegend in Münster

vorkommende CC45 zeigte auch in Manhiça kein PVL enthaltendes Isolat. Mit 54% zu 39% trugen signifikant mehr invasive Isolate in Manhiça das PVL kodierende Gen als kommensale Isolate. Es ergab sich ein p-Wert von $\leq 0,05$. PVL war somit nicht nur deutlich häufiger in Mosambik zu finden, sondern dort auch signifikant mit Invasivität assoziiert.

Tabelle 11: Relative Häufigkeit des *Staphylokokkus aureus* Oberflächenprotein G Gens *sasG* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>sasG</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	30%	0%	0%	25%
CC15	100%	100%	100%	100%
CC45	ag	0%	6%	0%
CC8	83%	83%	100%	100%
CC30	nn	ag	0%	0%
CC5	100%	100%	100%	100%
CC22	100%	nn	100%	100%
CC7	nn	ag	0%	0%
CC1	100%	100%	nn	ag
CC152	45%	0%	nn	nn
CC25	0%	0%	ag	ag
CC88	100%	100%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	0%
CC398	nn	nn	ag	0%
CC9	nn	nn	0%	ag
CC97	nn	nn	ag	100%
CC50	nn	nn	0%	nn
gesamt	64%	43%	39%	41%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Des Weiteren wurde ein Adhäsionsproteingen ausgewählt, das Gen des *Staphylococcus aureus* Oberflächenproteins G. Auffallend war, dass überregional ähnliche Genhäufigkeiten innerhalb eines klonalen Komplexes auftraten (Tabelle 11). Lediglich die Isolate des CC8 enthielten in Münster häufiger das *sasG* Gen (100% vs. 83%). Insgesamt waren in Manhiça mit 64% zu 43% deutlich mehr Kommensalen mit dem Oberflächenprotein Gen ausgestattet ($p \leq 0,01$). In Münster war dieses Verhältnis mit 41% zu 39% sehr ausgeglichen. Keines der 41 invasiven mosambikanischen Isolate des CC121, die sonst zahlreich mit Virulenzgenen ausgestattet waren, enthielt das *sasG* Gen. Somit war dies das Gen, das von allen hier dargestellten am seltensten in dem invasiven afrikanischen CC121 zu finden war. Allerdings wurde es in sieben der 23 kolonisierenden Isolate aus Manhiça (30%) detektiert. Innerhalb des CC121 bestätigte sich mit einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,001$, dass das *sasG* Gen bevorzugt in Kommensalen vertreten war (30% vs. 0%). Im CC152 waren mit 45% zu 0% ebenso mehr Kommensale mit dem Gen ausgestattet. Auch der CC45 bestätigt den Trend des *sasG* Gens zur Kolonisierung (6% vs. 0%). Der überwiegend in Münster detektierte CC22 war durchgehend zu 100% mit dem *sasG* Gen ausgestattet.

Tabelle 12: Relative Häufigkeit des Kapseltyp 5 Gens *cap5* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>cap5</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	0%	0%	0%	0%
CC15	0%	0%	0%	0%
CC45	ag	0%	0%	0%
CC8	100%	100%	100%	100%
CC30	nn	ag	0%	0%
CC5	100%	100%	100%	100%
CC22	100%	nn	100%	100%
CC7	nn	ag	0%	0%
CC1	0%	0%	nn	ag
CC152	100%	100%	nn	nn
CC25	100%	100%	ag	ag
CC88	0%	0%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	0%
CC398	nn	nn	ag	100%
CC9	nn	nn	100%	ag
CC97	nn	nn	ag	100%
CC50	nn	nn	0%	nn
gesamt	38%	20%	32%	35%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Tabelle 13: Relative Häufigkeit des Kapseltyp 8 Gens *cap8* in den einzelnen klonalen Komplexen (CC) der kommensalen (N) und invasiven (OB) Isolate aus Manhiça (MM) und Münster (MW).

<i>cap8</i>	MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB
CC121	100%	100%	100%	100%
CC15	100%	100%	100%	100%
CC45	ag	100%	100%	100%
CC8	0%	0%	0%	0%
CC30	nn	ag	100%	100%
CC5	0%	0%	0%	0%
CC22	0%	nn	0%	0%
CC7	nn	ag	100%	100%
CC1	100%	100%	nn	ag
CC152	0%	0%	nn	nn
CC25	0%	0%	ag	ag
CC88	100%	100%	nn	nn
CC101	nn	nn	ag	100%
CC398	nn	nn	ag	100%
CC9	nn	nn	0%	ag
CC97	nn	nn	ag	0%
CC50	nn	nn	100%	nn
gesamt	62%	80%	68%	65%

Die Tabelle wurde absteigend nach der absoluten Häufigkeit der klonalen Komplexe sortiert. Konnte ein CC in einer Subgruppe nicht nachgewiesen werden wurde dieses Tabellenfeld mit „nn“ ausgefüllt, kam ein CC weniger als dreimal in einer Subgruppe vor wurde er aus der Analyse ausgeschlossen („ag“). Die relativen Häufigkeiten wurden mit einer Farbskala unterlegt.

Als letztes wurde die Zuordnung der Kapseltypen zu den klonalen Komplexen aufgeschlüsselt. Das Gen des Kapseltyps 5 (*cap5*) kam ausschließlich in CC8, CC5, CC2, CC152, CC25, CC97, CC9 und CC398 vor und das des Kapseltyps 8 (*cap8*) ausschließlich in CC121, CC15, CC45, CC30, CC7, CC1, CC88, CC398 und CC50 (Tabelle 12 und Tabelle 13). Es zeigte sich eine 100%ige Kopplung von klonalem Komplex und Kapseltyp, unabhängig von Region oder Besiedlungsart. Innerhalb der mosambikanischen Isolate konnte *cap5* mit 38% vs. 20% signifikant häufiger in Träger- als in Patientenisolaten nachgewiesen werden ($p \leq 0,001$). Andersherum verhielt es sich mit dem Kapseltyp 8. 80% der mosambikanischen invasiven Isolate trugen *cap8*, aber nur 62% der kommensalen ($p \leq 0,001$). In den deutschen Stämmen hingegen war die Verteilung diesbezüglich sehr ausgeglichen (32% vs. 35% und 68% vs. 65%).

Zusammenfassend konnten auch unter den Virulenzgenen wieder Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Verteilung auf die klonalen Komplexe kommensaler und invasiver Isolate festgestellt werden. Stämme, die dem CC7, CC101 oder CC398 angehörten, besaßen keines der ausgewählten Virulenzgene. Der CC121 und der CC5 enthielten hingegen für jedes dieser Gene positive Isolate. Im Vergleich zu den Resistenzgenen verteilten sich die Virulenzgene oftmals identisch auf die vier Subgruppen innerhalb eines klonalen Komplexes, waren also hoch klonal. Das Pantone Valentine Leukocidin Gen konnte deutlich mit Invasivität der Isolate assoziiert werden und das Gen des *S. aureus* Oberflächenproteins G mit Kommensalismus.

4 Diskussion

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der prospektiven Erstellung einer gut definierten und dokumentierten *S. aureus*-Stammsammlung in Manhica (Mosambik), beispielhaft für eine Region im subsaharischen Afrika. Über ambulant erworbene *S. aureus*-Infektionen in Mosambik, insbesondere Bakteriämien [78, 88, 89], lagen bereits wenige Daten vor. Kolonisierende Isolate innerhalb der gesunden Bevölkerung wurden in Mosambik bis dato hingegen noch nicht gesammelt oder analysiert. Dies fand somit erstmals im Rahmen dieser Studie statt. Während des Forschungsaufenthaltes stellte sich erfreulicherweise heraus, dass die mikrobiologische Routinediagnostik in Manhica nahezu westlichen Standards entsprach. Aufgrund der zahlreichen laufenden Studien wurden Blutkulturen, Abszessmaterial und Sputum von Patienten des Manhica District Hospitals regelmäßig mikrobiologisch analysiert, so fanden die invasiven Isolate problemlos Eingang in diese Studie. Die Rekrutierung gesunder Probanden hingegen war neu und das Etablieren des Probensammelns mühsam. Alle Proben mussten aufwändig prozessiert werden, da es für die nasalen Abstriche nicht möglich war vom Laborstandard (SOP) abzuweichen. Die Erfahrung, dass es während des Aufenthaltes schwierig war kleine Veränderungen zu bewirken oder eigene Ideen zu verwirklichen machte auch der Freiburger Doktorand Jonas Hofmann, der im Rahmen des StaphNet-Projektes in Tansania *S. aureus*-Isolate sammelte [90]. Starke hierarchische Strukturen nannte auch er als Grund dafür.

Leider musste festgestellt werden, dass der nach westlichen Maßgaben konzipierte Fragebogen (CRF) dieser Studie vor Ort nicht valide ausgefüllt werden konnte. Zum einen war der CRF mit einer Länge von 7 DIN A4-Seiten in englischer Sprache nicht anwenderfreundlich gestaltet, zum anderen waren inhaltliche Angaben zu Probanden/Patienten erschwert. Neugeborene erhielten zwar einen Gesundheitspass bei der Geburt, in dem z.B. HIV- und Impfstatus eingetragen wurden, Erwachsene Studienteilnehmer hingegen wussten teilweise nicht einmal ihr Geburtsjahr, geschweige denn ihre Vorerkrankungen oder Risikofaktoren. Die Aussagen der vorliegenden Arbeit wurden durch diese Limitation jedoch nicht eingeschränkt, da ausschließlich die molekularbiologischen Eigenschaften der Isolate untersucht wurden und der CRF keine Berücksichtigung fand.

Klonale Komplexe

Im Hinblick auf klonale Beziehungen wurden *S. aureus*-Isolate in entwickelten Ländern bereits umfangreich analysiert, allerdings gibt es bis dato nur spärliche Informationen über die klonale Diversität in Afrika. Diese Arbeit zeigt einige Gemeinsamkeiten aber auch deutliche Unterschiede im Vorkommen der klonalen Komplexe in den Regionen Manhica und Münster auf.

Es konnten insgesamt 28 CCs innerhalb der Studienkohorte identifiziert werden, 15 davon kamen jedoch nur sporadisch vor ($n \leq 5$). Die vier häufigsten klonalen Komplexe CC121, CC15, CC45 und CC8 beherbergten bereits über 50% aller Isolate, insgesamt zehn CCs beherbergten 80%. Die Beobachtung, dass der Hauptanteil der Stämme sich auf wenige klonale Komplexe beschränkt, teilten viele epidemiologische Studien [91]. Nübel et al. folgerten, dass eine kleine Anzahl klonaler Komplexe sowohl lokal als auch global den Großteil der *S. aureus*-Population ausmacht, da diese ubiquitär in vielen Ländern auf allen Kontinenten vorkommen. Diese sind CC1, CC5, CC8, CC15, CC22, CC30, CC45, CC59, CC80, CC97 und CC121 [92]. Alle genannten CCs konnten auch in dieser Studie gefunden werden, sieben davon stellten sogar die häufigsten klonalen Komplexe dar. Der Vergleich zeigt also, dass die in dieser Arbeit am häufigsten detektierten Isolate pandemisch sind und zusätzlich einige seltene klonale Komplexe wie CC152, CC7 oder CC88 (mit $n > 5$) identifiziert werden konnten. Schaumburg et al. ermittelten 2014 die sechs häufigsten klonalen Komplexe unter MSSA-Isolaten in Afrika, indem sie in einer Metaanalyse aus 17 verschiedenen Studien jeweils die drei häufigsten CCs ermittelten. Das Ergebnis waren CC5, CC8, CC15, CC30, CC121 und CC152 [93]. Abgesehen von CC30 sind dies auch die häufigsten fünf in dieser Arbeit detektierten CCs in Mosambik. Das deutet darauf hin, dass es eine ähnliche CC-Verteilung innerhalb des afrikanischen Kontinentes gibt, doch Studien mit Teilnahme einer größeren Anzahl an afrikanischen Ländern wären notwendig, um dies zu bestätigen. Die Häufigkeit von CC30 in Mosambik war mit 1% vergleichsweise gering. Eine europäische Metaanalyse existiert bisher nicht, allerdings zeigt der Vergleich mehrerer Studien, dass sowohl dem CC45 als auch dem CC30 in Europa eine größere Bedeutung zukommt (z.B. CC45: 27% Schweden [94], 9% UK [95], 9% Portugal [96] vs. 2% Mali [95], 0% Kamerun, Madagaskar, Marokko, Niger und Senegal [97], 3% Ghana; CC30: 23% Schweden [94], 28% UK [95], 22% Portugal [96] vs. 5% Mali [95], 9% Multicenterstudie aus Kamerun, Madagaskar, Marokko, Niger und Senegal [97], 1% Ghana). Ruimy et al. zeigten bereits eine Prädominanz von CC45 und CC30 in Europa (dem Vereinigten Königreich) gegenüber Westafrika (Mali) [95]. Mit höchst signifikanten Unterschieden von 19% vs. 3% für CC45 und 14,5% vs. 1% für CC30 unterstützt diese Studie die Theorie der europäischen Dominanz der beiden Komplexe. Ruimy et al. zeigten in der gleichen Studie außerdem eine Prädominanz von CC15 in Mali gegenüber dem Vereinten Königreich. In den vorliegenden Daten bestätigt sich diese Tendenz von 17,5% in Mosambik zu 11,5% in Deutschland, jedoch ohne statistische Signifikanz. Studien, die postulieren CC45, CC30 und CC15 seien offensichtlich weltweit erfolgreiche Stämme, bestätigen, dass oft von entwickelten Ländern auf die ganze Welt geschlossen wird ohne die Validität solcher Theorien auch in Entwicklungsländern zu überprüfen. Die Idee dieser Studie war es daher ein europäisches mit einem afrikanischen Land unter gleichen Bedingungen

miteinander zu vergleichen, um valide Aussagen bzgl. der geografischen Unterschiede treffen zu können.

Die afrikanisch-deutsche StaphNet-Studie, in die neben diesen 400 noch weitere 800 *S. aureus*-Isolate aus Deutschland und Afrika Eingang fanden, zeigte eine afrikanische Dominanz der klonalen Komplexe CC15, CC121 und CC152; CC80 und CC88 waren sogar einzigartig in Afrika [98]. Der CC152, welcher in mehreren afrikanischen Studien dominierte (Mali 24% [95], Nigeria 31% [99], Ghana 25% [100]), kam in Mosambik mit 7,5% vergleichsweise selten vor, unterstützt durch den fehlenden Nachweis in Deutschland dennoch die Hypothese ein afrikanischer CC zu sein. Des Weiteren kam der CC88 mit 4,5% nur in Manhiça, aber nicht in Münster vor. Dies ist konsistent mit dem Vergleich zwischen Mali (5%) und dem Vereinten Königreich (0%) [95]. Auch in anderen afrikanischen Ländern ist der CC88 zu finden (Gabun 15% [101], Multicenterstudie aus Kamerun, Madagaskar, Marokko, Niger und Senegal 3% [97], Ghana 3% [100]). In keiner europäischen Studie mit MSSA konnte CC88 nachgewiesen werden, allerdings ist dieser CC bekannt als CA-MRSA [102] und diese Arbeit untersucht fast ausschließlich MSSA. Man könnte hypothetisieren, dass der CC88-MSSA ein möglicher Vorläufer des CC88-MRSA ist und sich dieser wiederum in Europa durchgesetzt hat.

Das eindrücklichste Ergebnis bei der regionalen Analyse der klonalen Komplexe stellt die Häufigkeit des CC121 in Mosambik dar. Vergleicht man die Prävalenz von CC121 in anderen Ländern fällt nicht nur auf, dass er überwiegend in Afrika vorkommt (z.B. 19% Multicenterstudie aus Kamerun, Madagaskar, Marokko, Niger und Senegal [97], 13% Ghana [100], 8% Nigeria [99], aber nur 0% Schweden [94], 0% UK [95], 5% Sachsen [91], 6% Portugal [96]), sondern dass Mosambik mit einer Prävalenz von 32% exorbitant heraussticht. Eine mögliche Erklärung für die lokale Prädominanz eines klonalen Komplexes könnte die Adaptation an lokale abiotische (Umwelt) oder biotische (Wirtspopulation) Bedingungen sein, eine kompetitive Überlegenheit gegenüber anderen klonalen Komplexen, oder eine räumlich begrenzte Übertragung.

Die Tatsache, dass sich elf CCs ausschließlich in Münster und drei ausschließlich in Manhiça nachweisen ließen, sollte nicht zu der Schlussfolgerung führen, diese Klone wären spezifisch für diese Regionen. Da sie meist nur sporadisch vorkamen, könnten stochastische Effekte oder durch das Probensammeln bedingte Artefakte zu Grunde liegen. Dennoch ist dies ein Hinweis auf eine größere klonale Diversität in Mosambik.

Es drängt sich die Frage auf, ob alle *S. aureus*-Stämme das gleiche krankheitsverursachende Potential besitzen oder ob invasive Erkrankungen besonders mit virulenten Genotypen oder klonalen Komplexen assoziiert sind. Day et al. mussten ihre Schlussfolgerung widerrufen, dass hypervirulente *S. aureus*-Klone besonders häufig in der bakteriellen Trägerpopulation zu

finden sind [103]. Letztlich folgerten sie, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Populationsstruktur zwischen Kommensalen und krankheitsassoziierten *S. aureus*-Stämmen gibt [104]. Auch Feil et al. konnten in einer gemischten Studie von 334 Isolaten keinen Zusammenhang zwischen klonalen Komplexen und Invasivität oder Kommensalismus feststellen [105]. Mit Ausnahme des CC121 reichten sich die hier erhobenen Daten ebenfalls in die Erkenntnis ein. Die Erklärung für diese Beobachtung ist einfach. Klonale Komplexe werden auf der Basis von sieben Genen des Kerngenoms gebildet, die per definitionem primär lebenswichtig sind, aber nicht zur Virulenz beitragen. Daher können Stämme, die reich an Virulenzgenen außerhalb des Kerngenoms sind und harmlose Stämme, demselben klonalen Komplex angehören und sich dennoch in ihrer Fähigkeit Krankheiten zu verursachen unterscheiden.

Mit dieser Arbeit fand zum ersten Mal eine detaillierte Charakterisierung von asymptomatisch kolonisierenden *S. aureus*-Isolaten im östlichen Afrika der Subsahara statt. Ein empirischer Vergleich von Kommensalen und invasiven *S. aureus*-Isolaten innerhalb einer Population fand in Afrika bisher nur im Rahmen der StaphNet-Studie statt. Hierbei wurde eine Assoziation der „afrikanischen“ Klone CC121 und CC152 mit Invasivität und eine Assoziation der „deutschen“ Klone CC45 und CC101 mit Kommensalismus festgestellt [98].

Als einzige Signifikanz in den erhobenen Daten dieser Studie fand sich eine deutliche Assoziation des CC121 mit klinischer Infektion in Manhiça (41% vs. 22,5%). In Gabun bestätigte sich dies nicht [59]. In Münster war kein Unterschied auszumachen und in einer chinesischen Studie von Fan et al. verhielt es sich sogar andersherum (17,6% Infektion vs. 34% Kolonisierung [106]). Dies bedeutet, dass die Diagnose CC121 allein eine limitierte Aussagekraft bzgl. der Invasivität eines Isolates hat. Epidemiologische Unterschiede zwischen den Orten an denen die Studiendaten erhoben wurden, können diese auffälligen Diskrepanzen erklären. Die zulässige Schlussfolgerung ist, dass der äußerst signifikant häufiger in Manhiça vorkommende CC121 speziell dort auch besonders häufig Infektionen hervorzurufen scheint. Nichtsdestotrotz sind weitere pan-afrikanische Studien notwendig, die Träger- und invasive Isolate vergleichen um die Assoziation von CC121 mit Invasivität zu verifizieren.

Der CC1 und der CC152 konnten in Mosambik mehr als doppelt so oft in kommensalen Isolaten als in klinischen Isolaten detektiert werden, jedoch ohne signifikanten Unterschied ($p=0,08$ und $p=0,1$). In Gabun hingegen wurde eine signifikante Assoziation von Isolaten mit klinischer Infektion zu CC1 und CC88 festgestellt [59].

Lüdicke et al. fanden eine signifikante Assoziation von CC15 mit asymptomatisch kolonisierenden Isolaten in Sachsen (17% vs. 6%) [91]. Die chinesische Studie von Fan et al. bestätigte den Zusammenhang von CC15 und Kommensalismus [106]. Zwar ergab der exakte

Fisher Test keine Signifikanz ($p=0,074$), allerdings kam der CC15 mit 16% zu 7% in Münster mehr als doppelt so oft in kommensalen Stämmen vor. Diese Beobachtung könnte darauf hinweisen, dass Isolate, die sich dem CC15 zuordnen lassen, in manchen Regionen eine vergleichsweise niedrige Virulenz bzw. ein geringes Potenzial haben invasive Infektionen zu verursachen.

Resistenzgene (*mecA*, *blaZ*, *tetK*, *tetM*, *fosB*, *van*)

Die Einführung von antimikrobiellen Substanzen hat die antibiotische Pharmakotherapie zu einer der wichtigsten Säulen der modernen Medizin gemacht. Allerdings hat die Resistenzentwicklung unter den Bakterien aufgrund des ständigen selektiven antibiotischen Druckes dramatisch zugenommen, nicht zuletzt wegen der zunehmenden Mobilität der Menschen, Tiere und Nahrungsmittel über den gesamten Globus hinweg [107]. Mehrfache Antibiotikaresistenzen in verbreiteten pathogenen Bakterienstämmen, die zu sogenannten multiresistenten Bakterien führen, sind ein weltweites Anliegen [108].

Auf die Frage hin, ob mehr antibiotikaresistente Bakterien in Afrika oder Europa vorkämen, schätzten viele Befragte spontan Europa als resistenzreicher ein. Ein Grund für diese Annahme war z.B., dass in Afrika kaum Medikamente zur Verfügung stehen würden und sich somit durch den geringeren Antibiotikaeinsatz weniger Resistenzen bilden könnten. Ein anderer Erklärungsansatz lag in den Medien begründet, die vielmals von der Zunahme multiresistenter Erreger berichten und beispielsweise den prophylaktischen Einsatz von Antibiotika in der Tiermast der Industrienationen kritisieren. So herrschte zunächst Erstaunen, als diese Studie genau das Gegenteil, nämlich höhere Resistenzraten in Mosambik, zeigte. Doch während des siebenwöchigen Forschungsaufenthaltes in Manhica wurde schnell klar, woran das lag (s.u.).

In dieser Arbeit konnte für sechs Resistenzgene ein signifikant häufigeres Vorkommen in Mosambik im Vergleich zu Deutschland gezeigt werden, darunter Gene, die Resistenzen gegen β -Laktame (*blaZ*), Makrolide (*ermC*), Lincosamide (*ermC*), Tetrazykline (*tetK* und *tetM*) und Fosfomycin (*fosB*) vermitteln. Lediglich das Erythromycin-Resistenzgen *ermA* war signifikant häufiger in Deutschland (6% vs. 1%). Das *mecA* Gen wurde in nur 12 der 400 *S. aureus*-Isolate detektiert, sodass anzumerken ist, dass diese Studie zu 97% MSSA-Isolate betrachtet und nicht unkritisch mit MRSA-Studien verglichen werden sollte. Diese niedrige detektierte Prävalenz von 3% MRSA-Isolaten sowohl in Manhica als auch in Münster kann in erster Linie darauf zurückgeführt werden, dass es sich in dieser Studie ausschließlich um ambulant erworbene („community acquired“) Isolate handelt und keine Isolate nosokomial erworbener („health care acquired“) Infektionen eingeschlossen wurden, in denen die MRSA Prävalenz nachweislich höher liegt. In Beira, einem nördlich von Manhica gelegenen Ort in Mosambik, wurde die Rate von CA-MRSA in 75 Haut- und Weichteilinfektionen im Jahr 2011

mit 1% bestimmt. Die Rate von HA-MRSA hingegen lag in 24 postoperativen und Verbrennungswunden bei 33% [89]. Eine weitere Studie aus Deutschland detektierte das *mecA* Gen in 2% der Trägerisolate und 6% der Knochen- und Gelenksinfektionen, welche auch nosokomialen Ursprungs waren [91]. Diese Daten unterstützen die niedrige MRSA Prävalenz in ambulant erworbenen *S. aureus*-Isolaten in Deutschland und Mosambik.

Das β -Laktamase Resistenzgen *blaZ* wurde in Mosambik mit 90% deutlich ($p \leq 0,001$) häufiger detektiert als in Deutschland mit 69%. Eine Metaanalyse aus 40 Artikeln verschiedener afrikanischer Länder (Tansania, Sambia, Demokratische Republik Kongo, Mosambik) zeigte Resistenzraten gegen Penicillin von 85-90% [109]. Die o.g. Studie aus Beira konnte in 95% der Fälle eine Penicillinresistenz nachweisen [89], eine nigerianische Studie 86% [99]. Ähnlich hohe Resistenzraten gegen Penicillin wie in Manhiça scheinen also im subsaharischen Afrika verbreitet zu sein. Interessant ist an dieser Stelle, dass *blaZ* in nahezu allen Isolaten des in Afrika verbreiteten CC121 vorkam. In den anderen klonalen Komplexen war die *blaZ* Ausstattung dagegen inhomogen. Der ebenfalls in Afrika häufige CC152 wies hingegen nur zu unterdurchschnittlichen 74% *blaZ* auf. Eine mögliche Erklärung für die hohe Penicillin-Resistenzrate könnte die gute Verfügbarkeit und daher häufige Anwendung von Penicillin in diesen Entwicklungsländern sein. Penicilline gelten noch immer als Goldstandard bei *S. aureus*-Infektionen und sind günstig in der Herstellung. In Deckung mit dieser Arbeit gab das Robert-Koch-Institut im Antibiotika Resistenz Überwachungsbericht des Jahres 2012 ebenfalls eine Rate von 69,6% penicillinresistenter Stämme in Deutschland an [17]. Diese niedrigere Resistenzrate könnte beispielsweise darauf zurückzuführen sein, dass hier oftmals gleichzeitig β -Laktamase-Inhibitoren verabreicht werden und sich so weniger Resistenzen bilden können.

Die Tetrazyklinresistenz vermittelnden Gene waren ebenfalls signifikant häufiger in Mosambik als in Deutschland. Shittu et al. [99] zeigten eine gute Korrelation von Geno- und Phänotyp. Bei Isolaten, die im Scheibendiffusionstest gegen Tetrazyklin resistent waren, konnte eines der Tetrazyklinresistenz vermittelnden Gene *tetK* oder *tetM* in ihrem Genom nachgewiesen werden. Diese Beobachtung spricht für eine gute Übertragbarkeit der Resistenzdaten eines Isolats auf dessen tatsächliche phänotypische Tetrazyklinresistenz.

Shittu et al. zeigten für Nigeria Resistenzraten gegen Tetrazyklin von 47%. In Beira wurde in 53% der Isolate eine Tetrazyklinresistenz nachgewiesen [89] und die Metaanalyse der 4 subsaharischen Länder ergab 28-48% Häufigkeit [109]. Addiert man die Häufigkeiten der Tetrazyklinresistenz vermittelnden Gene *tetK* und *tetM* in dieser Studie, so erhält man eine Resistenzrate gegen Tetrazyklin von 47% in Mosambik und 5,5% in Deutschland. Auch die Tetrazyklinresistenz scheint somit im afrikanischen Raum eine größere Rolle zu spielen als in Deutschland. Lüdike et al. detektierten *tetK* in 3,4% und *tetM* in 1,7% der Isolate aus Knochen- und Gelenkinfektionen in Dresden [91], was sich mit 4,5% und 1% dieser Studie in

Münster deckt. In den erhobenen Daten konnte eine 90%ige Korrelation von *tetK* und CC88 erfasst werden. Nach dem aktuellen Wissensstand wurde dies erstmals beschrieben. Erfreulicherweise wurden weder in Mosambik noch in Deutschland Gene detektiert, die eine Resistenz gegen Vancomycin vermitteln. Auch in anderen Studien aus Afrika und Europa wurden keine oder minimale Vancomycinresistenzen ermittelt. In afrikanischen Ländern mag das daran liegen, dass Vancomycin kaum verfügbar ist und in europäischen Ländern an dem verantwortungsbewussten Umgang mit diesem Reserveantibiotikum.

Das Fosfomycinresistenz vermittelnde Gen *fosB* war mit 72% signifikant häufiger in mosambikanischen Isolaten als in deutschen mit 54,5% ($p \leq 0,001$). Außerdem wies es in Mosambik mit 79% zu 65% einen signifikanten Trend zur Invasivität auf ($p \leq 0,05$). Die genauere Analyse zeigte eine nahezu 100%ige Korrelation von *fosB* zu den klonalen Komplexen CC5, CC8, CC9, CC25, CC30, CC101 und CC121. In der Literatur konnten hierzu keine Daten ausfindig gemacht werden. Mit dieser Studie wurde also erstmals die ausgeprägte Klonalität von *fosB* erfasst. Warum *fosB*, obwohl es, wie viele andere Resistenzen auf mobilen genetischen Elementen liegt, nur in bestimmten klonalen Komplexen vorkommt, sollte in weiteren Studien erforscht werden. Die Phänotypische Fosfomycinresistenz lag im Jahr 2012 in Deutschland laut dem RKI bei 1,4% [17]. Für *fosB* besteht also eine deutliche Diskrepanz zwischen Geno- und Phänotyp. Aufgrund von Mutationen und unterschiedlichem Selektionsdruck ist es möglich, dass die Gene zwar vorhanden sind, aber nicht aktiv exprimiert werden. Daher sind Expressionsanalysen separat für jedes einzelne Gen notwendig, um die Übertragbarkeit von Geno- auf Phänotyp zu evaluieren.

Grundsätzlich gibt es viele Faktoren, die nachvollziehbar erklären können, warum Antibiotikaresistenzen in Manhica so häufig sind. Mosambik ist eines der ärmsten Länder der Welt, daher ist die Wahl der antibiotischen Therapie oft einzig und allein durch die Verfügbarkeit von Antibiotika gesteuert [89]. In Mosambik sind mikrobiologische Einrichtungen selten und als Konsequenz ist die antibiotische Therapie meist empirisch. Diese empirische Behandlung von Patienten im Manhica District Hospital folgt den mosambikanischen nationalen Richtlinien. Allerdings sind wiederum wenige Daten verfügbar um die Resistenzentwicklung zu überwachen und die Behandlungsrichtlinien stets zu aktualisieren [110]. Falls eine *in vitro* Empfindlichkeitstestung möglich ist, wird die empirische Therapie reevaluiert und angepasst, sofern möglich [110]. In Deutschland hingegen überwacht das Robert Koch-Institut jährlich die Resistenzentwicklung aller Bakterien und gibt entsprechende Therapie-Leitlinien heraus. Sogar einzelne Krankenhäuser haben eigene Therapieempfehlung, adaptiert an die lokale Resistenzsituation. In Industrieländern wird der Gebrauch von Antibiotika strikt kontrolliert, was in Entwicklungsländern nicht der Fall ist. In Mosambik werden gängige Antibiotika ohne Verschreibung zu günstigsten Preisen

ausgegeben, was zu Selbstmedikation und konsekutiv falscher Anwendung führt. Andererseits sind weniger gebräuchliche, jedoch effektivere Antibiotika aus Kostengründen nicht zugänglich. Diese beiden Tatsachen konnten während des Forschungsaufenthaltes in Manhiça vor Ort festgestellt werden. Mangelnde Compliance bei der Einnahme verschriebener Antibiotika ist zudem ein bekannter Faktor für die Resistenzbildung in Entwicklungsländern [111]; die Einnahme wird zu früh beendet, Blister werden geteilt oder übriggebliebene Antibiotika verwendet [112]. In Manhiça kommt es arbeitsbedingt saisonal zu starker Migration nach Südafrika [113], was nicht nur die HIV-Prävalenz nach oben treibt, sondern auch Einfluss auf Antibiotikaresistenzen haben könnte [110]. „Mehr als irgendein anderer Sachverhalt bleiben Armut und inadäquater Zugang zu Medikamenten eine Hauptkraft in der Entwicklung von Resistenzen“, so die Weltgesundheitsorganisation [114]. Daher besteht dringender Handlungsbedarf, um die Resistenzentwicklung auch in armen Ländern aufzuhalten, denn Antibiotikaresistenzen sind ein weltweites Problem, das deletäre Langzeiteffekte haben kann.

Virulenzgene (*egc*, *seb*, *sed*, PVL, *cap5*, *cap8*)

S. aureus produziert eine Vielzahl von Virulenzfaktoren, unter anderem Sekretionsprodukte wie Exotoxine und Enzyme, aber auch Oberflächen-assoziierte Adhäsine wie MSCRAMMs oder Kapselpolysaccharide. Da *S. aureus* ein Kommensale ist und sich wie ein opportunistisches Pathogen verhält, ist anzunehmen, dass verschiedene Virulenzfaktoren zusammen mit prädisponierenden Wirtsfaktoren eine signifikante Rolle für die Invasivität spielen [94]. Mit dieser Arbeit wurde erstmals die Virulenzgenausstattung von *S. aureus*-Stämmen innerhalb Mosambiks eruiert und Unterschiede im regionalen Vergleich mit Deutschland aufgedeckt.

In den untersuchten Daten kamen außer dem Enterotoxin E-Gen (*see*) alle Toxingene regelmäßig vor. Mit 54% am häufigsten wurde das *egc*-Gencluster detektiert, welches aus den Enterotoxingenen *seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo* und *seu* besteht. Ähnliche Prävalenzen konnten auch in anderen Studien gefunden werden (*egc*: 52% und 46% in Sachsen [91, 115], 58% in Norwegen [116], 64% in Schweden [94]; *seg*: 43% in Nigeria [117], 44% und 30% in Gabun [59, 101]). Zwischen den beiden Regionen wies das *egc*-Cluster keinen signifikanten Unterschied auf. Allerdings zeigte sich in mosambikanischen Isolaten eine Assoziation von *egc* und Invasivität ($p < 0,05$). Dieses Erkenntnis sollte vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass *egc* eine starke CC-Korrelation aufweist und zu 100% in Isolaten des CC121 nachgewiesen werden konnte. Da CC121 selbst nachweislich mit Invasivität assoziiert ist und zudem überrepräsentiert in Isolaten aus Mosambik, könnte hier ein Selektionsbias vorliegen. Außerdem steht die Beobachtung im Widerspruch zu der von Rasmussen et al 2013 gezeigten Assoziation von *egc* mit Kolonisierung [94]. Auch Ferry et al zeigten 2005 eine

negative Assoziation von *egc* mit der Schwere einer Infektion [118]. Anzumerken ist, dass beide o.g. Studien ausschließlich Bakteriämie-Isolate untersuchten, welche in dieser Population unterrepräsentiert waren. Um dem weiter nachzugehen, müssten die Daten dieser Studie genauer nach klinischer Manifestation der invasiven Stämme aufgeschlüsselt werden. Die Grundlage dafür wurde durch die ausführliche Datenerhebung bereits geschaffen, die Auswertung ist für die Zukunft geplant. Die in dieser Arbeit detektierte Korrelation von *egc* zu den klonalen Komplexen CC5, CC20, CC22, CC25, CC30 und CC45 deckt sich mit den Angaben in der Literatur [94, 119].

In der Klasse der Enterotoxine konnten die Gene *seb*, *sek*, *seq* und ORF CM14 signifikant häufiger in Mosambik detektiert werden. Nur für *seb* (34% vs. 7,5%) lagen bisher Vergleichsdaten aus Afrika vor. Diese bestätigten mit 29,5% in Trägerisolaten aus Nigeria [117] und 20,6% in Isolaten aus Pygmäen in Gabun [101] das Überwiegen des *seb* Gens in Afrika im Vergleich zu Europa mit 6,7% in Schweden [94] und 6,8% in einer deutschen Multicenter Studie [120]. Daten aus kommensalen und invasiven Isolaten aus Gabun fielen mit durchschnittlich nur 7,8% jedoch wieder aus dem Raster [59].

Für das Enterotoxin D-Gen (*sed*) ließ sich zwar kein regionaler Unterschied in der Prävalenz ausmachen, dafür aber ein signifikanter Trend zu Invasivität in Münster (16% vs. 3%, $p < 0,01$). Diesen Zusammenhang zeigte bereits eine deutsche Studie aus dem Jahr 2002 beim Vergleich von Bakteriämie- und Trägerisolaten ($p < 0,05$) [120]. Unter den Isolaten aus Mosambik konnte das *sed* Gen hingegen signifikant häufiger in Trägerisolaten detektiert werden. Mit nur zehn *sed* positiven Stämmen in Manhiça ist die Aussagekraft dieses Ergebnisses jedoch als eingeschränkt zu beurteilen.

Eines der eindrucklichsten Ergebnisse dieser Arbeit war die Prädominanz des Panton Valentine Leukocidin Gens (PVL) in Manhiça (46,5%) gegenüber Münster (1,5%) ($p < 0,001$). PVL kodiert für Zytotoxine, welche Gewebnekrose und Leukozytenzerstörung verursachen, indem sie Poren in Zellmembranen formen. Breurec et al. fanden in einer Multicenter Studie aus fünf afrikanischen Städten eine Durchschnittsprävalenz von 57% für PVL [97]. Dabei fiel auf, dass PVL signifikant häufiger in West- und Zentralafrika zu finden war als in Nordafrika und Madagaskar (72% Senegal, 77% Niger, 71% Kamerun vs. 17% Marokko und 33% Madagaskar.) Die in dieser Arbeit detektierte PVL Prävalenz in Mosambik als ostafrikanischem Land lag mit 46,5% im Mittelfeld. Weitere Studien innerhalb Ostafrikas wären notwendig um eine valide Aussage bzgl. der dortigen PVL-Prävalenz treffen zu können. Parallel zu dieser Arbeit läuft bereits eine Studie in Tansania mit u.a. diesem Ziel. Weitere afrikanische PVL-Häufigkeitsraten lagen in Pygmäen in Gabun bei 56%, in Mali bei 24% und Nigeria bei 39% [95, 101, 117]. In europäischen Ländern fanden sich ähnliche niedrige PVL-Raten wie in Münster (Sachsen 3,4% und 0,65%, Schweden 0,75%, Norwegen 2,3% [91, 94, 115, 116]).

Aus Mosambik lag bisher nur eine Studie aus Beira zum Vergleich vor [89]. Hier konnte PVL in 90,7% aller ambulant erworbenen *S. aureus*-Isolate nachgewiesen werden. Diesem exorbitanten Wert könnte jedoch ein Selektionsbias zugrunde liegen, da die ambulanten Stämme ausschließlich aus Abszessmaterial gewonnen wurden und PVL bekanntermaßen an Abszessbildung beteiligt ist. Die Assoziation von PVL und Abszessen bestätigte u.a. auch eine große holländische Studie, in der 38,9% der aus Abszessen gewonnenen Isolate PVL-positiv waren, aber nur 0,6% der 829 Kommensalen-Isolate [121]. In Gabun war der Zusammenhang von PVL mit Infektion im Vergleich zu Kolonisierung ebenfalls signifikant (57,4% vs. 40,5%) [59]. In den vorliegenden Daten bestätigte sich die Prädominanz von PVL in invasiven Isolaten (54%) gegenüber kolonisierenden (39%) ($p < 0,05$). Monecke et al. postulierten, dass PVL-positive *S. aureus*-Isolate aufgrund der niedrigen Rate asymptomatischer PVL-Trägerschaft als obligate Pathogene und nicht als fakultative betrachtet werden sollten [115]. Diese Konsequenz kann in Anbetracht der oben beschriebenen Datenlage für Europa gezogen werden, sollte jedoch nicht auf Afrika übertragen werden (bei 39% asymptomatischer PVL-Trägerschaft). Die o.g. Studie aus Beira zeigte weiterhin eine signifikant häufigere PVL-Genausstattung in MSSA als in MRSA (81,1% vs. 11,1%), was zuvor ebenfalls in Nigeria beschrieben wurde [122]. Der Grund für die hohe Prävalenz von PVL-positiven MSSA in Afrika ist bisher unklar und sollte weiter erforscht werden. Die PVL Gene sind ebenso wie das Methicillin-Resistenz vermittelnde *mecA* Gen auf mobilen genetischen Elementen gelegen. PVL-positive MSSA könnten somit ein Reservoir für PVL Gene darstellen, welche folglich durch horizontalen Gentransfer in *S. aureus*-Stämme inkorporiert werden könnten, entweder bevor oder nachdem sie auch das *mecA* Gen akquiriert haben [123]. Bedingungen in Afrika, die das Risiko einer interindividuellen Übertragung fördern (schlechter Zugang zu Gesundheitseinrichtungen, mangelnde hygienische Bedingungen und Überbevölkerung), kombiniert mit der hohen Prävalenz von PVL-positiven *S. aureus*-Isolaten, haben das Potenzial zur Entstehung und Verteilung von hoch virulenten PVL-positiven MRSA-Klonen zu führen [97]. Dies gibt Anlass zu großer Sorge und erfordert eine strenge Überwachung, da das Aufkommen eines hoch virulenten und gleichzeitig resistenten Keims, insbesondere in Afrika, dramatische Konsequenzen haben könnte. Schaumburg et al. brachten die Frage auf, ob sich die „out-of-Africa“ Hypothese, die für *Helicobacter pylori* gezeigt werden konnte [124], ebenso für PVL-positive *S. aureus*-Klone bewahrheiten könnte [101]. Ruimy et al. stellten bereits die Hypothese auf, dass der PVL-positive MSSA-ST152 Klon in Afrika seinen Ursprung gefunden hat, dann nordwärts ins Zentrum von Europa migriert ist und dort die Methicillin-Resistenz akquiriert hat. Denn in Europa findet sich MRSA-ST152 [95].

In ihrer Studie zeigten Ruimy et al. eine 100%ige Korrelation von PVL und CC152 in asymptomatischen Trägerisolaten in Mali. Auch in dieser Arbeit war der CC152 mit 94,5% der am häufigsten mit PVL ausgestattete klonale Komplex. In Münster fanden sich keine diesem

CC zugehörigen Stämme. In Nigeria wiederum fand sich nur eine 56%ige Korrelation [99]. PVL wurde jedoch in vielen klonalen Komplexen gefunden, was indiziert, dass PVL in verschiedenen phylogenetischen Subpopulationen eingeführt wurde [119]. Nur in Stämmen des CC8 und CC45 ließ sich in Mosambik kein PVL nachweisen. Auffällig war außerdem, dass die klinischen Isolate der charakteristisch afrikanischen CC25, CC88 und CC152 eine 100%ige PVL-Korrelation aufwiesen. In mosambikanischen Isolatens des mit Invasivität assoziierten CC121 konnte PVL interessanterweise nur zu durchschnittlich 81,5% nachgewiesen werden. Es ist also anzunehmen, dass weitere Virulenzfaktoren für den Erfolg des CC121 in Mosambik verantwortlich sind.

Das *S. aureus*-Oberflächenprotein G (*sasG*) zeigt widersprüchliche Charakteristiken; Es verhindert die Adhäsion an extrazelluläre Matrixkomponenten wie Fibronektin, Cytokeratin 10 und IgG, während es gleichzeitig die Adhäsion an nasale Epithelzellen sowie die Biofilmbildung fördert [125]. So erscheint es logisch, dass *sasG* die Kolonisierung des Nasenvorhofes unterstützt und in dieser Arbeit signifikant ($p < 0,01$) mit Kommensalismus assoziiert war. Allerdings galt dies nur für die mosambikanischen Isolate. Da *sasG* gut mit der CC-Zugehörigkeit korreliert und selten in Isolatens des CC121 vorkommt, welche in Mosambik und Infektionen überrepräsentiert waren, könnte diese Tatsache durch Klonalität verzerrt sein. Denn andere Studien zeigten bereits eine Assoziation von *sasG* und invasiver Erkrankung [94]. Die vollständige Korrelation von *sasG* und den klonalen Komplexen CC5, CC8, CC15 und CC22 sowie die negative Korrelation mit CC25 und CC30 stand im Einklang mit bereits zuvor beschriebenen Daten [91, 94].

Diverse andere MSCRAMM Gene, wie *clfA*, *clfB*, *ebpS*, *eno*, *fnbA* oder *vwb* finden sich sowohl in Isolatens aus Manhiça als auch in denen aus Münster nahezu immer. Diese Beobachtung machten bereits Monecke et al [115] und führten es darauf zurück, dass diese Gene im *S. aureus*-Genom hoch konserviert sind [126].

Alle untersuchten Isolate besaßen entweder den Kapseltyp 8 oder 5. Mit 68,75% dominierte *cap8* gegenüber *cap5* mit 31,25%. Ein interregionaler Unterschied zwischen Manhiça und Münster konnte dabei nicht festgestellt werden. Auch andere Regionen wiesen ähnliche Verteilungen auf. (*cap8*: Deutschland 62%, Norwegen 74%, Schweden 71%, Gabun 73%; *cap5*: Deutschland 38%, Norwegen 26%, Schweden 29%, Gabun 26%). In allen Studien addierten sich die Häufigkeiten ebenfalls auf 100%, *cap1* kam nie vor. Dass der Kapseltyp an die CC-Zuordnung gekoppelt ist [94] bestätigte sich in der CC-Analyse. *cap5* kam ausschließlich in CC8, CC5, CC2, CC152, CC25, CC97, CC9, CC398 vor und *cap8* in CC121, CC15, CC45, CC30, CC7, CC1, CC88, CC398, CC50. Dies stand im Einklang mit den Ergebnissen von Monecke et al. [115] und Rasmussen et al. [94]. Außerdem kamen mosambikanische Isolate, die mit dem Kapseltyp 5 Gen ausgestattet waren signifikant häufiger

in Invasiven Isolaten vor ($p < 0,01$) und solche mit *cap8* in kolonisierenden. Dies steht im Widerspruch zu einer MSSA-Studie aus Schweden von 2013, in der mit $p < 0,05$ eine Assoziation von *cap5* zu Invasivität (Bakteriämie) festgestellt wurde [94]. Es ist jedoch zu bedenken, dass diese Assoziationen eine Konsequenz der Klonalität und gar nicht durch den Kapseltyp selbst bedingt sein könnten. Das in die Biofilm-Formation involvierte Oberflächenprotein Gen *bap* konnte in dieser wie allen o.g. Studien nicht nachgewiesen werden.

Für die Virulenzgene mit Ausnahme von PVL ließen sich ähnliche Häufigkeiten in invasiven und kolonisierenden Stämmen finden. Es gibt verschiedene Interpretationsmöglichkeiten für diese Beobachtung. Toxingene z.B. spielen vermutlich in der Pathogenese von Abszessen und Bakteriämien etc. keine Rolle und daher spiegelt deren Prävalenz in infizierenden Stämmen die Situation in kolonisierenden wieder. Manche Virulenzgene könnten ganz einfach in Kommensalen wie Pathogenen die gleiche Funktion ausüben wie z.B. Leukozytenzerstörung auf Schleimhäuten. Außerdem spielen Wirtsfaktoren in der Pathogenese eine wichtige Rolle. Ein eindrückliches Beispiel dafür ist das menstruelle „toxic shock Syndrom“, zu dem es nur aufgrund der unphysiologischen Bedingungen durch Tragen eines Tampons kommt. Das könnte erklären, warum viele Virulenzfaktoren zwar häufig im Genom zu finden sind, aber nicht regelmäßig ihre Wirkung entfalten [115]. Um das zu genauer zu verstehen sind weitere Expressionsstudien vonnöten.

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit einige interessante Resultate erzielt werden. Die quantitativ häufigsten klonalen Komplexe der Arbeit waren pandemische CCs. CC45 und CC30 zeigten eine europäische Dominanz, CC121, CC152 und CC88 hingegen eine afrikanische. Auffallend war die exorbitante Prädominanz von CC121 mit 32% in Mosambik sowie die höchst signifikante Assoziation dieses CCs mit Invasivität. Die Diversität der klonalen Komplexe überwog in Münster. Resistenzgene konnten insgesamt häufiger in Mosambik nachgewiesen werden, MRSA war jedoch in beiden Regionen selten. Auch Virulenzgene waren insgesamt häufiger in Mosambik. Das eindrücklichste Ergebnis war die Prädominanz von PVL in Mosambik und dort in invasiven Erkrankungen. Es zeigte sich eine Korrelation von PVL und den charakteristisch afrikanischen klonalen Komplexen CC88 und insbesondere CC152. *sasG* wies in Mosambik eine Assoziation zu Kolonisierung auf, *egc* zu Invasivität, beides war jedoch mutmaßlich durch Klonalität verzerrt. Außerdem ließ sich der Kapseltyp 5 signifikant häufiger in Invasiven Isolaten nachweisen, der Kapseltyp 8 dagegen in kolonisierenden.

Ein großer Vorteil dieser Studie war die hohe Fallzahl von 400 untersuchten Isolaten, sowie die exakt ausgeglichenen Untergruppen zu je 100 Isolaten. Nicht im Detail ausgeglichen waren hingegen die Probanden- und Patientenpopulation. In Manhiça wurden Probanden

überwiegend im pädiatrischen OPD rekrutiert, waren also akut an etwas Anderem erkrankt, und fast ausschließlich Kleinkinder. Somit spiegeln die rekrutierten Probanden nicht genau die Gesellschaftsstruktur wieder. Bei der Patientenrekrutierung wurde nicht festgesetzt welche klinischen Manifestationen in welchem Verhältnis Eingang in die Studie finden sollten. Hierdurch könnten ebenfalls Verzerrungen verursacht worden sein (z.B. durch Überwiegen von Abszessproben und damit konsekutiver PVL-Dominanz in Manhiça). Sehr positiv und einzigartig in diesem Ausmaß, zumindest in Afrika, war jedoch die ausführliche Dokumentation der klinischen und epidemiologischen Daten (soweit möglich) sowie mikrobiologischen Eigenschaften im CRF. Hiermit wurde die Grundlage für eine detaillierte Analyse dieser Informationen geschaffen, welche in dieser Arbeit unberücksichtigt blieb. Spannend wäre die Auswertung der erfassten Risikofaktoren für Besiedlung und Infektion mit *S. aureus* wie beispielsweise HIV-Infektion und Malaria.

Die DNA Microarray-Technologie stellte sich als hervorragende Methode heraus um relativ kostengünstig eine große Probenanzahl zu charakterisieren. Im Vergleich zur etablierteren *spa*- und MLST-Typisierung konnte hier neben der Zuordnung der einzelnen *S. aureus*-Isolate zu klonalen Komplexen zeitgleich die Ausstattung mit Resistenz- und Virulenzgenen erfasst werden. Eine Limitierung des Microarrays ist, dass die Detektion auf Gene beschränkt ist, die vom Hersteller vorgegeben wurden, und einer ständigen Aktualisierung benötigen. Eine Studie von Strauß et al. konnte eine 96,8%ige Korrelation der mittels Microarray und Ganzgenomsequenzierung detektierten Gene zeigen [127]. Um neue Virulenzfaktoren zu entdecken oder genauere phylogenetische Analysen durchzuführen wären die Ganzgenomsequenzierung oder SNP-Analyse die sinnvolleren Methoden. Allerdings sind diese Verfahren aktuell (noch) nicht in großer Menge als Routine praktikabel und sollten bestimmten Fragestellungen vorbehalten bleiben. Im Rahmen des StaphNet-Projektes sind bereits weitere Gen- und Expressionsanalysen unter Berücksichtigung der im CRF erhobenen Daten geplant.

Durch Etablierung der Genanalyse in der weltweiten Forschung und gezielten Expressionsstudien lässt sich in Zukunft vielleicht verstehen, welche Kommensalen aufgrund ihrer Genausstattung das Potenzial besitzen zu invasiven Krankheitserregern zu werden und welche Infektionsmanifestation jeweils am wahrscheinlichsten ist. Potenziell gefährliche Kommensalen könnten dann frühzeitig prophylaktisch eradiziert werden wohingegen harmlose Kolonisierer bewusst verbreitet werden könnten. In der klinischen Routine angewandt, stellt die Genotypisierung, z.B. mittels Microarray, einen vielversprechenden Ausblick dar, um Diagnostik und Therapie effizient durchzuführen. Es ist denkbar, gezielt gegen den Genotyp gerichtete Therapien zu entwickeln und in der klinischen Praxis anzuwenden. Infektionsketten in medizinischen Einrichtungen ließen sich so einfach verfolgen und schneller unterbrechen.

Die Entstehung hoch virulenter und multiresistenter Klone ließe sich überwachen und frühzeitig kontrollieren.

Für das Vorgehen in der Klinik bedeuten diese Ergebnisse, dass die etablierten Richtlinien für die rationale Therapie mit geschützten Penicillinen und Cephalosporinen bei ambulant erworbenen *S. aureus*-Infektionen unverändert zu empfehlen sind, da MRSA sowohl in Deutschland als auch in Afrika eine geringe Bedeutung hat.

5 Literaturverzeichnis

1. Gordon, R.J. and F.D. Lowy, *Pathogenesis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection*. Clin Infect Dis, 2008. **46 Suppl 5**: p. S350-9.
2. Kluytmans, J., A. van Belkum, and H. Verbrugh, *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*. Clin Microbiol Rev, 1997. **10**(3): p. 505-20.
3. Wertheim, H.F., et al., *The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections*. Lancet Infect Dis, 2005. **5**(12): p. 751-62.
4. von Eiff, C., et al., *Nasal carriage as a source of Staphylococcus aureus bacteremia. Study Group*. N Engl J Med, 2001. **344**(1): p. 11-6.
5. Laupland, K.B., et al., *Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections*. J Infect Dis, 2003. **187**(9): p. 1452-9.
6. Ogston, A., *Micrococcus Poisoning*. J Anat Physiol, 1882. **17**(Pt 1): p. 24-58.
7. *List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published*. international Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010. **60**: p. 469-472.
8. Gotz F, B.T., Schleifer K-H., *The genera Staphylococcus and Micrococcus*. The Prokaryotes, ed. T.A. Balows A, Dworkin M, et al ed. 2006, New York: Springer Science+Business Media.
9. Feng, Y., et al., *Evolution and pathogenesis of Staphylococcus aureus: lessons learned from genotyping and comparative genomics*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(1): p. 23-37.
10. Kuroda, M., et al., *Whole genome sequence of Staphylococcus saprophyticus reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13272-7.
11. Takeuchi, F., et al., *Whole-genome sequencing of staphylococcus haemolyticus uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species*. J Bacteriol, 2005. **187**(21): p. 7292-308.
12. Gill, S.R., et al., *Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain*. J Bacteriol, 2005. **187**(7): p. 2426-38.
13. Dufour, P., et al., *High genetic variability of the agr locus in Staphylococcus species*. J Bacteriol, 2002. **184**(4): p. 1180-6.
14. Lindsay, J.A. and M.T. Holden, *Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of Staphylococcus aureus*. Funct Integr Genomics, 2006. **6**(3): p. 186-201.
15. Baba, T., et al., *Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA*. Lancet, 2002. **359**(9320): p. 1819-27.
16. McCormick, J.K., J.M. Yarwood, and P.M. Schlievert, *Toxic shock syndrome and bacterial superantigens: an update*. Annu Rev Microbiol, 2001. **55**: p. 77-104.
17. Koch-Institut, R., *Antibiotika Resistenz Surveillance*. 2012.
18. Pereira, P.M., et al., *Fluorescence ratio imaging microscopy shows decreased access of vancomycin to cell wall synthetic sites in vancomycin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(10): p. 3627-33.
19. Arthur, M. and P. Courvalin, *Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci*. Antimicrob Agents Chemother, 1993. **37**(8): p. 1563-71.
20. Weisblum, B., *Erythromycin resistance by ribosome modification*. Antimicrob Agents Chemother, 1995. **39**(3): p. 577-85.
21. Levin, T.P., et al., *Potential clindamycin resistance in clindamycin-susceptible, erythromycin-resistant Staphylococcus aureus: report of a clinical failure*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(3): p. 1222-4.
22. Ross, J.I., et al., *Identification of a chromosomally encoded ABC-transport system with which the staphylococcal erythromycin exporter MsrA may interact*. Gene, 1995. **153**(1): p. 93-8.
23. Meka, V.G. and H.S. Gold, *Antimicrobial resistance to linezolid*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(7): p. 1010-5.

24. Burdett, V., *tRNA modification activity is necessary for Tet(M)-mediated tetracycline resistance*. J Bacteriol, 1993. **175**(22): p. 7209-15.
25. Guffanti, A.A. and T.A. Krulwich, *Tetracycline/H⁺ antiport and Na⁺/H⁺ antiport catalyzed by the Bacillus subtilis TetA(L) transporter expressed in Escherichia coli*. J Bacteriol, 1995. **177**(15): p. 4557-61.
26. Yamaguchi, A., et al., *The tetracycline efflux protein encoded by the tet(K) gene from Staphylococcus aureus is a metal-tetracycline/H⁺ antiporter*. FEBS Lett, 1995. **365**(2-3): p. 193-7.
27. Yamada, Y., et al., *Gene cloning and characterization of SdrM, a chromosomally-encoded multidrug efflux pump, from Staphylococcus aureus*. Biol Pharm Bull, 2006. **29**(3): p. 554-6.
28. Gesellschaft, D.D., *S2-Leitlinie: Staphylococcus aureus bedingte Infektionen der Haut und Schleimhäute, Diagnostik und Therapie*. AWMF online.
29. Jarraud, S., et al., *egc, a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in Staphylococcus aureus*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 669-77.
30. Novick, R.P., *Mobile genetic elements and bacterial toxins: the superantigen-encoding pathogenicity islands of Staphylococcus aureus*. Plasmid, 2003. **49**(2): p. 93-105.
31. Cheung, A.L., S.J. Projan, and H. Gresham, *The Genomic Aspect of Virulence, Sepsis, and Resistance to Killing Mechanisms in Staphylococcus aureus*. Curr Infect Dis Rep, 2002. **4**(5): p. 400-410.
32. Panton P, V.F., *Staphylococcal toxins*. Lancet, 1932. **222**: p. 506-508.
33. von Eiff, C., et al., *Prevalence of genes encoding for members of the staphylococcal leukotoxin family among clinical isolates of Staphylococcus aureus*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2004. **49**(3): p. 157-62.
34. Moran, G.J., et al., *Methicillin-resistant S. aureus infections among patients in the emergency department*. N Engl J Med, 2006. **355**(7): p. 666-74.
35. Vandenesch, F., et al., *Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence*. Emerg Infect Dis, 2003. **9**(8): p. 978-84.
36. Lina, G., et al., *Involvement of Panton-Valentine leukocidin-producing Staphylococcus aureus in primary skin infections and pneumonia*. Clin Infect Dis, 1999. **29**(5): p. 1128-32.
37. Proctor, R.A., J.M. Balwit, and O. Vesga, *Variant subpopulations of Staphylococcus aureus as cause of persistent and recurrent infections*. Infect Agents Dis, 1994. **3**(6): p. 302-12.
38. Oliveira, K., et al., *Direct identification of Staphylococcus aureus from positive blood culture bottles*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(2): p. 889-91.
39. Besier, S., et al., *Prevalence and clinical significance of Staphylococcus aureus small-colony variants in cystic fibrosis lung disease*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(1): p. 168-72.
40. Harbarth, S., et al., *Evaluation of rapid screening and pre-emptive contact isolation for detecting and controlling methicillin-resistant Staphylococcus aureus in critical care: an interventional cohort study*. Crit Care, 2006. **10**(1): p. R25.
41. Noskin, G.A., et al., *The burden of Staphylococcus aureus infections on hospitals in the United States: an analysis of the 2000 and 2001 Nationwide Inpatient Sample Database*. Arch Intern Med, 2005. **165**(15): p. 1756-61.
42. Cosgrove, S.E., et al., *The impact of methicillin resistance in Staphylococcus aureus bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2005. **26**(2): p. 166-74.
43. Mylotte, J.M. and A. Tayara, *Staphylococcus aureus bacteremia: predictors of 30-day mortality in a large cohort*. Clin Infect Dis, 2000. **31**(5): p. 1170-4.
44. Wisplinghoff, H., et al., *Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study*. Clin Infect Dis, 2004. **39**(3): p. 309-17.
45. Diekema, D.J., et al., *Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999*. Clin Infect Dis, 2001. **32 Suppl 2**: p. S114-32.

46. Gerald L. Mandell, J.E.B., Raphael Dolin, *Principles and Practice of Infectious Diseases*, ed. E.C.P. Edition. Vol. 7. 2010: Elsevier.
47. Hidron, A.I., et al., *NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007*. Infect Control Hosp Epidemiol, 2008. **29**(11): p. 996-1011.
48. Zhanel, G.G., et al., *Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(4): p. 1430-7.
49. Fowler, V.G., Jr., et al., *Staphylococcus aureus endocarditis: a consequence of medical progress*. JAMA, 2005. **293**(24): p. 3012-21.
50. Hoban, D.J., et al., *Pathogen of occurrence and susceptibility patterns associated with pneumonia in hospitalized patients in North America: results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Study (2000)*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003. **45**(4): p. 279-85.
51. Mulholland, E.K. and R.A. Adegbola, *Bacterial infections--a major cause of death among children in Africa*. N Engl J Med, 2005. **352**(1): p. 75-7.
52. Tice, A.D., P.A. Hoaglund, and D.A. Shoultz, *Risk factors and treatment outcomes in osteomyelitis*. J Antimicrob Chemother, 2003. **51**(5): p. 1261-8.
53. Blyth, M.J., et al., *The changing epidemiology of acute and subacute haematogenous osteomyelitis in children*. J Bone Joint Surg Br, 2001. **83**(1): p. 99-102.
54. Styers, D., et al., *Laboratory-based surveillance of current antimicrobial resistance patterns and trends among Staphylococcus aureus: 2005 status in the United States*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2006. **5**: p. 2.
55. Laupland, K.B., et al., *Burden of community-onset bloodstream infection: a population-based assessment*. Epidemiol Infect, 2007. **135**(6): p. 1037-42.
56. Wertheim, H.F., et al., *Risk and outcome of nosocomial Staphylococcus aureus bacteraemia in nasal carriers versus non-carriers*. Lancet, 2004. **364**(9435): p. 703-5.
57. Kuehnert, M.J., et al., *Prevalence of Staphylococcus aureus nasal colonization in the United States, 2001-2002*. J Infect Dis, 2006. **193**(2): p. 172-9.
58. Gorwitz, R.J., et al., *Changes in the prevalence of nasal colonization with Staphylococcus aureus in the United States, 2001-2004*. J Infect Dis, 2008. **197**(9): p. 1226-34.
59. Schaumburg, F., et al., *Virulence factors and genotypes of Staphylococcus aureus from infection and carriage in Gabon*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(10): p. 1507-13.
60. Jacobsson, G., et al., *The epidemiology of and risk factors for invasive Staphylococcus aureus infections in western Sweden*. Scand J Infect Dis, 2007. **39**(1): p. 6-13.
61. Pittet, D., et al., *Effectiveness of a hospital-wide programme to improve compliance with hand hygiene. Infection Control Programme*. Lancet, 2000. **356**(9238): p. 1307-12.
62. Williams, R.E., et al., *Nasal staphylococci and sepsis in hospital patients*. Br Med J, 1959. **2**(5153): p. 658-62.
63. van Rijen, M., et al., *Mupirocin ointment for preventing Staphylococcus aureus infections in nasal carriers*. Cochrane Database Syst Rev, 2008(4): p. CD006216.
64. Deurenberg, R.H., et al., *The molecular evolution of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Clin Microbiol Infect, 2007. **13**(3): p. 222-35.
65. Oliveira, D.C., A. Tomasz, and H. de Lencastre, *Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Lancet Infect Dis, 2002. **2**(3): p. 180-9.
66. Enright, M.C., et al., *The evolutionary history of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(11): p. 7687-92.
67. Robinson, D.A. and M.C. Enright, *Evolutionary models of the emergence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2003. **47**(12): p. 3926-34.
68. Friedrich, A.W., et al., *A European laboratory network for sequence-based typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) as a communication platform between human and veterinary medicine--an update on SeqNet.org*. Euro Surveill, 2008. **13**(19).

69. Kuhn, G., P. Francioli, and D.S. Blanc, *Double-locus sequence typing using clfB and spa, a fast and simple method for epidemiological typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(1): p. 54-62.
70. Malachowa, N., et al., *Comparison of multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis with pulsed-field gel electrophoresis, spa typing, and multilocus sequence typing for clonal characterization of Staphylococcus aureus isolates*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(7): p. 3095-100.
71. Strommenger, B., et al., *spa Typing of Staphylococcus aureus as a frontline tool in epidemiological typing*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(2): p. 574-81.
72. Deurenberg, R.H., et al., *The Staphylococcus aureus lineage-specific markers collagen adhesin and toxic shock syndrome toxin 1 distinguish multilocus sequence typing clonal complexes within spa clonal complexes*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2009. **65**(2): p. 116-22.
73. Monecke, S., P. Slickers, and R. Ehricht, *Assignment of Staphylococcus aureus isolates to clonal complexes based on microarray analysis and pattern recognition*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2008. **53**(2): p. 237-51.
74. Robinson, D.A., et al., *Evolutionary genetics of the accessory gene regulator (agr) locus in Staphylococcus aureus*. J Bacteriol, 2005. **187**(24): p. 8312-21.
75. Milheirico, C., D.C. Oliveira, and H. de Lencastre, *Update to the multiplex PCR strategy for assignment of mec element types in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother, 2007. **51**(9): p. 3374-7.
76. Ruffing, U., et al., *Matched-cohort DNA microarray diversity analysis of methicillin sensitive and methicillin resistant Staphylococcus aureus isolates from hospital admission patients*. PLoS One, 2012. **7**(12): p. e52487.
77. Berkley, J.A., et al., *Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya*. N Engl J Med, 2005. **352**(1): p. 39-47.
78. Sigauque, B., et al., *Community-acquired bacteremia among children admitted to a rural hospital in Mozambique*. Pediatr Infect Dis J, 2009. **28**(2): p. 108-13.
79. Collignon, P.J., et al., *Health care-associated Staphylococcus aureus bloodstream infections: a clinical quality indicator for all hospitals*. Med J Aust, 2006. **184**(8): p. 404-6.
80. Talbert, A.W., et al., *Invasive bacterial infections in neonates and young infants born outside hospital admitted to a rural hospital in Kenya*. Pediatr Infect Dis J, 2010. **29**(10): p. 945-9.
81. Anah, M.U., et al., *Neonatal septicaemia in Calabar, Nigeria*. Trop Doct, 2008. **38**(2): p. 126-8.
82. Onipede, A.O., et al., *Invasive bacteria isolates from children with severe infections in a Nigerian hospital*. J Infect Dev Ctries, 2009. **3**(6): p. 429-36.
83. Mugalu, J., et al., *Aetiology, risk factors and immediate outcome of bacteriologically confirmed neonatal septicaemia in Mulago hospital, Uganda*. Afr Health Sci, 2006. **6**(2): p. 120-6.
84. Ojukwu, J.U., et al., *Neonatal septicemia in high risk babies in South-Eastern Nigeria*. J Perinat Med, 2006. **34**(2): p. 166-72.
85. Kern, W.V., *Management of Staphylococcus aureus bacteremia and endocarditis: progresses and challenges*. Curr Opin Infect Dis, 2010. **23**(4): p. 346-58.
86. Herrmann, M., et al., *Staphylococcal disease in Africa: another neglected 'tropical' disease*. Future Microbiol, 2013. **8**(1): p. 17-26.
87. K. Adelhelm, C.C.T.G., Jena/Deutschland, *Präsentation Unternehmens- und Mitarbeiter-Profil*. 25. April 2004.
88. Rovira, G., et al., *The Challenge of Diagnosing and Treating Staphylococcus aureus Invasive Infections in a Resource-limited Sub-Saharan Africa Setting: A Case Report*. J Trop Pediatr, 2015. **61**(5): p. 397-402.
89. van der Meeren, B.T., et al., *Emergence of methicillin resistance and Panton-Valentine leukocidin positivity in hospital- and community-acquired Staphylococcus aureus infections in Beira, Mozambique*. Trop Med Int Health, 2014. **19**(2): p. 169-76.
90. Hofmann, J., *Forschungsaufenthalt in Tansania – Infektiologie*. Medizinernachwuchs.de, 2011.
91. Luedicke, C., et al., *Molecular fingerprinting of Staphylococcus aureus from bone and joint infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010. **29**(4): p. 457-63.

92. Nubel, U., et al., *From types to trees: reconstructing the spatial spread of Staphylococcus aureus based on DNA variation*. Int J Med Microbiol, 2011. **301**(8): p. 614-8.
93. Schaumburg, F., et al., *New epidemiology of Staphylococcus aureus infection in Africa*. Clin Microbiol Infect, 2014. **20**(7): p. 589-96.
94. Rasmussen, G., et al., *Prevalence of clonal complexes and virulence genes among commensal and invasive Staphylococcus aureus isolates in Sweden*. PLoS One, 2013. **8**(10): p. e77477.
95. Ruimy, R., et al., *The carriage population of Staphylococcus aureus from Mali is composed of a combination of pandemic clones and the divergent Pantone-Valentine leukocidin-positive genotype ST152*. J Bacteriol, 2008. **190**(11): p. 3962-8.
96. Tavares, A., et al., *Population structure of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus (MSSA) in Portugal over a 19-year period (1992-2011)*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2014. **33**(3): p. 423-32.
97. Breurec, S., et al., *Epidemiology of methicillin-susceptible Staphylococcus aureus lineages in five major African towns: high prevalence of Pantone-Valentine leukocidin genes*. Clin Microbiol Infect, 2011. **17**(4): p. 633-9.
98. Ruffing, U., et al., *Community-Associated Staphylococcus aureus from Sub-Saharan Africa and Germany: A Cross-Sectional Geographic Correlation Study*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 154.
99. Shittu, A.O., et al., *Antibiotic resistance and molecular epidemiology of Staphylococcus aureus in Nigeria*. BMC Microbiol, 2011. **11**: p. 92.
100. Egyir, B., et al., *Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of clinical Staphylococcus aureus from healthcare institutions in Ghana*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e89716.
101. Schaumburg, F., et al., *Population structure of Staphylococcus aureus from remote African Babongo Pygmies*. PLoS Negl Trop Dis, 2011. **5**(5): p. e1150.
102. Oosthuysen, W.F., et al., *In vitro characterization of representative clinical South African Staphylococcus aureus isolates from various clonal lineages*. New Microbes New Infect, 2014. **2**(4): p. 115-22.
103. Day, N.P., et al., *A link between virulence and ecological abundance in natural populations of Staphylococcus aureus*. Science, 2001. **292**(5514): p. 114-6.
104. Day, N.P., et al., *Retraction*. Science, 2002. **295**(5557): p. 971.
105. Feil, E.J., et al., *How clonal is Staphylococcus aureus?* J Bacteriol, 2003. **185**(11): p. 3307-16.
106. Fan, J., et al., *Biogeography and virulence of Staphylococcus aureus*. PLoS One, 2009. **4**(7): p. e6216.
107. Hawkey, P.M., *The growing burden of antimicrobial resistance*. J Antimicrob Chemother, 2008. **62 Suppl 1**: p. i1-9.
108. Livermore, D.M., *Fourteen years in resistance*. Int J Antimicrob Agents, 2012. **39**(4): p. 283-94.
109. Mshana, S.E., M. Matee, and M. Rweyemamu, *Antimicrobial resistance in human and animal pathogens in Zambia, Democratic Republic of Congo, Mozambique and Tanzania: an urgent need of a sustainable surveillance system*. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2013. **12**: p. 28.
110. Mandomando, I., et al., *Antimicrobial drug resistance trends of bacteremia isolates in a rural hospital in southern Mozambique*. Am J Trop Med Hyg, 2010. **83**(1): p. 152-7.
111. Hart, C.A. and S. Kariuki, *Antimicrobial resistance in developing countries*. BMJ, 1998. **317**(7159): p. 647-50.
112. Planta, M.B., *The role of poverty in antimicrobial resistance*. J Am Board Fam Med, 2007. **20**(6): p. 533-9.
113. Nhacolo, A.Q., et al., *Levels and trends of demographic indices in southern rural Mozambique: evidence from demographic surveillance in Manhica district*. BMC Public Health, 2006. **6**: p. 291.
114. Organization, W.H., *Overcoming antimicrobial resistance*. 2000.
115. Monecke, S., et al., *Molecular epidemiology of Staphylococcus aureus in asymptomatic carriers*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009. **28**(9): p. 1159-65.

116. Blomfeldt, A., et al., *Molecular characterization of methicillin-sensitive Staphylococcus aureus isolates from bacteremic patients in a Norwegian University Hospital*. J Clin Microbiol, 2013. **51**(1): p. 345-7.
117. Kolawole, D.O., et al., *Characterization of colonizing Staphylococcus aureus isolated from surgical wards' patients in a Nigerian university hospital*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68721.
118. Ferry, T., et al., *Comparative prevalence of superantigen genes in Staphylococcus aureus isolates causing sepsis with and without septic shock*. Clin Infect Dis, 2005. **41**(6): p. 771-7.
119. van Belkum, A., et al., *Co-evolutionary aspects of human colonisation and infection by Staphylococcus aureus*. Infect Genet Evol, 2009. **9**(1): p. 32-47.
120. Becker, K., et al., *Prevalence of genes encoding pyrogenic toxin superantigens and exfoliative toxins among strains of Staphylococcus aureus isolated from blood and nasal specimens*. J Clin Microbiol, 2003. **41**(4): p. 1434-9.
121. Melles, D.C., et al., *Natural population dynamics and expansion of pathogenic clones of Staphylococcus aureus*. J Clin Invest, 2004. **114**(12): p. 1732-40.
122. Shittu, A., et al., *Characterization of methicillin-susceptible and -resistant staphylococci in the clinical setting: a multicentre study in Nigeria*. BMC Infect Dis, 2012. **12**: p. 286.
123. O'Hara, F.P., et al., *A geographic variant of the Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin toxin and the origin of community-associated methicillin-resistant S. aureus USA300*. J Infect Dis, 2008. **197**(2): p. 187-94.
124. Linz, B., et al., *An African origin for the intimate association between humans and Helicobacter pylori*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 915-8.
125. Corrigan, R.M., et al., *The role of Staphylococcus aureus surface protein SasG in adherence and biofilm formation*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 8): p. 2435-46.
126. Sabat, A., et al., *Distribution of the serine-aspartate repeat protein-encoding sdr genes among nasal-carriage and invasive Staphylococcus aureus strains*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(3): p. 1135-8.
127. Strauss, L., et al., *Detecting Staphylococcus aureus Virulence and Resistance Genes: a Comparison of Whole-Genome Sequencing and DNA Microarray Technology*. J Clin Microbiol, 2016. **54**(4): p. 1008-16.

6 Publikationen

U. Ruffing, A. Alabi, T. Kazimoto, D. Vubil, R. Akulenko, S. Abdulla, P. Alonso, M. Bischoff, A. Germann, M. P. Grobusch, V. Helms, J. Hofmann, W. Kern, P.G Kremsner, I. Mandomando, A. Mellmann, G. Peters, F. Schaumburg, S. Schubert, L. Strauss, M. Tanner, H. V. Briesen, L. Wende, L. von Müller, M. Herrmann (2017). *Community-Associated Staphylococcus aureus from Sub-Saharan Africa and Germany: A Cross-Sectional Geographic Correlation Study*. Scientific Reports, 7(1): Seite 154.

U. Ruffing, R. Akulenko, L. Wende, S. Schubert, T. Kazimoto, D. Vubil, A. Alabi, F. Schaumburg, W. Kern, M. Herrmann, L. von Müller (2014). *Molecular Epidemiology of Staphylococcus aureus Infections in Germany and Africa - a Multicenter Cohort Study using DNA Microarray to Characterize Invasive and Commensal Community-associated Isolates*. Posterpräsentation, ICCAC 2014 in Washington.

U. Ruffing, R. Akulenko, L. Wende, S. Schubert, T. Kazimoto, D. Vubil, A. Alabi, M. Herrmann, F. Schaumburg, W. Kern (2014). *DNA microarray based genotyping of 1200 Staphylococcus aureus isolates of the African-German StaphNet multicentre study*. Posterpräsentation, 24. European Congress of Medical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID) in Barcelona, Seite 221.

U. Ruffing, A. Abraham, S. Abdulla, R. Akulenko, H. von Briesen, A. Germann, M. Grobusch, V. Helms, T. Kazimoto, W. Kern, I. Mandomando, A. Mellmann, L. von Müller, G. Peters, F. Schaumburg, S. Schubert, D. Vubil, L. Wende, M. Herrmann (2014). *Molecular genotyping of 1200 community acquired commensal and clinical Staphylococcus aureus isolates of the African-German StaphNet multicenter study*. Kongressbeitrag, 66. Jahrestagung der DGHM/4. Gemeinsame Tagung von DGHM und VAAM, Dresden, Abstract Biospektrum, Tagungsband zur 4. Gemeinsamen Konferenz von DGHM und VAAM, Seite 121.

U. Ruffing, S. Schubert, L. Wende, T. Kazimoto, S. Abdulla, R. Akulenko, A. Alabi, M. Bischoff, A. Germann, A. Friedrich, M.P. Grobusch, V. Helms, J. Hofmann, W. Kern, I. Mandomando, A. Mellmann, G. Peters, F. Schaumburg, D. Vubil, M. Herrmann, L. von Müller (2013). *African and German multicenter screening study of 1200 Staphylococcus aureus isolates*. Kongressbeitrag, 65. Jahrestagung der DGHM, Rostock. Abstract International Journal of Medical Microbiology Volume 303, Supplement 1, Seite 77.

S. Schubert, L. Wende, U. Ruffing, M. Bischoff, W. Kern, J. Hofmann, S. Abdulla, F. Schaumburg, G. Peters, A. Alabi, M. Grobusch, I. Mandomando, A. Mellmann, A. Germann, M. Herrmann, L. von Müller (2012). *Characterisation of Staphylococcus aureus isolates of an African and German multicenter screening by DNA microarray-based genotyping*. Posterpräsentation, 64. Jahrestagung der DGHM, Hamburg. Abstract International Journal of Medical Microbiology Volume 302, Supplement 1, Seite 87.

7 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Lutz von Müller für die Betreuung meiner Doktorarbeit sowie für seine wissenschaftliche und menschliche Unterstützung.

Weiterhin gilt mein Dank Ulla Ruffing, die mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand; sei es bei den Versuchen, der Literaturrecherche, der Niederschrift oder den Korrekturen.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Ko-Doktorandin Laura Stichter, geb. Wende, für die konstruktive, motivierende und stets sehr angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Beteiligten bedanken, die es mir ermöglichten den siebenwöchigen Aufenthalt in Manhiça zu realisieren. Hierbei gilt mein Dank insbesondere Delfino Vubil, meinem Mentor vor Ort, für die herzliche Betreuung sowie Dr. Inacio Mandomando für die Organisation.

Meinem Partner Philip Weber danke ich für sein liebevolles Verständnis und seine unermüdliche Stärkung von Beginn der Doktorarbeit an bis zur ihrer Vollendung.

Für die wichtige Unterstützung bei der Formatierung meiner Arbeit sowie die fortwährende Motivation danke ich meinem Bruder Stephan Schubert.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mein Studium realisiert und mich auf meinem bisherigen Lebensweg unterstützt haben.

8 Anhang

8.1 Case Report Form

Im Folgenden ist der Fragebogen (Case Report Form) der dieser Arbeit zugrundeliegenden StaphNet-Studie aufgeführt. Exemplarisch für die drei Manifestationen „nasal carriage“ (N), „bloodstream infection“ (B) und „others“ (O) ist hier der Fragebogen zur nasalen Kolonisation abgedruckt.

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form *S. aureus* nasal carriage

Reset

Unique patient identifier

- N

Study site - N (nasal carriage) patient no. (e.g. 001)

IT = Ifakara-Bagamoyo/Tanzania, LG = Lambaréné/Gabon, MM = Manhica/Mozambique,
FR = Freiburg i.Br., HS = Homburg-Saar, MVW = Münster/Westfalen

General information

- Subject name (to be filled in the printed version):
- Date of birth (ddmmyyyy):
- Gender: ☐ male ☐ female
- Date of study inclusion (date of initial [culture-positive] sampling) (ddmmyyyy):

Inclusion criteria (all must be met)

- Written/signed informed consent: confirm ☐
- NO hospitalization within the last 4 weeks: confirm ☐
- NO antibacterial treatment within the last 4 weeks: confirm ☐
- NO antituberculous treatment within the last 4 weeks: confirm ☐
- Patient is eligible: confirm ☐

Investigator

Signature

Date

NOTE: After completion of this CRF, please send CRF saved under the unique patient identifier (see above to the left-hand side) to the data center via crf@uks.eu, print it, add information needed locally, sign it and store it at a safe place.

You will soon receive an excel file with data exported from this CRF for your cross-check and for uploading during preregistration of biomaterials from this case.

Name of responsible local study nurse/data manager

Date CRF completed and sent (ddmmyyyy):

Case Report Form

S. aureus nasal carriage

Demographic data

- Place of birth (country):
- Ethnicity:
- Place of residence
 - name of city or village/county (or region)
 - country
 - postal code (if available):
 - GPS coordinates:

(to be filled in the printed version if possible; for later reporting during biomaterials preregistration)

Patient history

- Had the subject been hospitalized 6 months until 4 weeks prior to sampling: ☐yes ☐no ☐unknown

NOTE: Patients newly admitted are eligible, but patients previously hospitalized within the last 4 weeks are ineligible.

- Diseased person: ☐yes ☐no
 - if yes, describe (pathology / organ system):

- if yes, newly admitted to hospital: ☐yes ☐no ☐unknown
- Continuous residency in a nursing home before sampling: ☐yes ☐no ☐unknown

Risk factors/comorbidities/underlying disease

- Intravenous drug abuse (IVDA): ☐yes ☐no ☐unknown
- Intravascular catheter(s) present prior to disease onset: ☐yes ☐no ☐unknown
- Other intravascular foreign bodies (i.e. artificial heart valves): ☐yes ☐no ☐unknown
 - if yes, please specify

Case Report Form

S. aureus nasal carriage

- Other foreign bodies (i.e. arthroplasty): ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - if yes, please specify
- HIV infection: ☐ yes ☐ no ☐ unknown
- Charlson comorbidity score items
 - Myocardial infarction/coronary heart disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Congestive heart failure ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Peripheral vascular disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Cerebrovascular disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Dementia ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Chronic obstructive pulmonary disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Connective tissue disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Peptic ulcer disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Mild liver disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - OR moderate-severe liver disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Diabetes mellitus ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - OR diabetes mellitus with organ damage ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Hemiplegia ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Moderate-severe renal disease ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Any tumour (within last 5 years) ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Lymphoma ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Leukemia ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Metastatic solid tumor ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - AIDS ☐ yes ☐ no ☐ unknown
- McCabe-Jackson underlying disease prognosis score items
 - Does the patient have an underlying acute, fulminant disease expected to be rapidly (weeks/months) fatal ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Does the patient have a chronic, incurable condition that is expected to be fatal within the next few years? ☐ yes ☐ no ☐ unknown
 - Does the patient have a chronic condition not expected to be fatal within the next 4 years? ☐ yes ☐ no ☐ unknown

Case Report Form
S. aureus nasal carriage

- Current parasitic diseases (results within 7 days prior or subsequent to initial positive *S. aureus* sampling)
 - Positive blood smear for *Plasmodium* sp:
 if positive: date of sampling (ddmmyyyy)
 number of trophozoites [/μL]
or negative/not done/unknown ☐

 - Positive blood smear for microfilariae:
 if positive: date of sampling (ddmmyyyy)
 species of *Filaria*
or negative/not done/unknown ☐

 - Positive stool sampling for intestinal helminths / ova:
 if positive: date of sampling (ddmmyyyy)
 species species 1
 species 2
 species 3
or negative/not done/unknown ☐

 - Positive urine microscopy for *S. haematobium*:
 if positive: date of sampling (ddmmyyyy)
or negative/not done/unknown ☐

Case Report Form

S. aureus nasal carriage

Microbiology (initial isolate)

Antibiogram

- | | |
|---------------------------------|---|
| - penicillin | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |
| - cefoxitin | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |
| - tetracycline | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |
| - erythromycin | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |
| - clindamycin | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |
| - gentamicin | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |
| - chloramphenicol | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |
| - trimethoprim-sulfamethoxazole | <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> I <input type="checkbox"/> R <input type="checkbox"/> unknown |

E-test results (MIC in µg/mL)

- | | |
|---------------|--|
| - Cefoxitin | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> |
| - Clindamycin | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> |
| - Linezolid | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> |
| - Vancomycin | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> |
| - Daptomycin | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> |
| - Tigecycline | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> . <input type="text"/> <input type="text"/> |

Other tests

- MRSA detection ☐ yes ☐ no ☐ unknown

if yes, describe method/result

- Induced clindamycin resistance ☐ yes ☐ no ☐ unknown

Case Report Form

S. aureus nasal carriage

Sampling *S. aureus* isolates

Initial isolate

- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Confirm nasal site of sampling: ☐
- Local laboratory identifier/number *S. aureus* isolate:
- Unique *S. aureus* study isolate label: -N -I1 Study site/subject no.

Second isolate

- Not done ☐
- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Site of sampling:
- Local laboratory identifier/number *S. aureus* isolate:
- Unique *S. aureus* study isolate label: -N -I2 Study site/subject no.

Third isolate

- Not done ☐
- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Site of sampling:
- Local laboratory identifier/number *S. aureus* isolate:
- Unique *S. aureus* study isolate label: -N -I3 Study site/subject no.

NOTE: Please send appropriately labelled materials as soon as possible to central storage facility. Note that you need to preregister at the StaphNet-Portal all specimens to be shipped; preregistration includes uploading the CRF data in an exported excel file as provided by the data center.

Name of responsible lab technician:

Do you confirm that the above data on sampling and labelling are correct: ☐

Infection Biology and Epidemiology of Staphylococci and Staphylococcal Diseases in Sub-Saharan Africa (DFG PAK296)

Case Report Form *S. aureus* nasal carriage

Plasma/serum sampling

First serum / plasma

- Not done ☐
- Date of serum / plasma sampling (ddmmyyyy):
- Local laboratory identifier/number serum/plasma sample:
- Unique serum label: -N -S1 Study site/subject no.
- Unique plasma label: -N -P1 Study site/subject no.

Second serum / plasma

- Not done ☐
- Date of serum / plasma sampling (ddmmyyyy):
- Local laboratory identifier/number serum/plasma sample:
- Unique serum label: -N -S2 Study site/subject no.
- Unique plasma label: -N -P2 Study site/subject no.

Third serum / plasma


- Not done ☐
- Date of sampling (ddmmyyyy):
- Local laboratory identifier/number serum/plasma sample:
- Unique serum label: -N -S3 Study site/subject no.
- Unique plasma label: -N -P3 Study site/subject no.

NOTE: Please send appropriately labelled materials as soon as possible to central storage facility. Note that you need to preregister at the StaphNet-Portal all specimens to be shipped; preregistration includes uploading the CRF data in an exported excel file as provided by the data center.

Name of responsible lab technician:

Do you confirm that the above data on sampling and labelling are correct: ☐

8.2 vereinfachter Case Report Form für Manhiça

	<p>Infecção biológica e epidemiologia de Estafilococos e doença estafilocócica em Manhiça, Moçambique</p> <p>Portadores nasais de <i>S.aureus</i></p>
---	--

Informação geral

- Nome completo _____
- Data de nascimento ____/____/____
- Sexo M ☐ F ☐
- Colar NIDA aqui

Critérios de inclusão

- ☐ Consentimento informado assinado
- ☐ Sem hospitalização dentro das últimas 4 semanas
- ☐ Sem tratamento antibiótico nas últimas 4 semanas
- ☐ Sem tratamento antituberculose nas últimas 4 semanas
- ☐ Paciente é elegível

Dados do Paciente

- Local de nascimento (país) _____
- Residência (Vila/Bairro) _____
- Perm-ID _____
- O Paciente foi hospitalizado 6 meses antes da colheita Sim ☐ Não ☐
- Diagnostico _____
- HIV Positivo ☐ Negativo ☐ Desconhecido ☐
- AIDS Sim ☐ Não ☐
- Feito teste de Malária Não ☐ Sim ☐ → colar NIDA aqui _____

Investigador

Assinatura

Data

8.3 Protokoll DNA-Aufreinigung

DNA-Extraktion:

Clontech Kit Protokoll:

- 200 µl Lysepuffer A1 zum Lyseverstärker A2 (kleines, farbloses Pellet) geben und in Lösung bringen
- Eine Impföse gefüllt mit *S. aureus* Isolat zu dem A1/A2 Reagenz hinzugeben

DNeasy Blood and Tissue Kit Protokoll:

- Für mindestens 30 Minuten bei 37°C auf dem Thermorüttler mit 550 rpm inkubieren
- 40 µl (Abweichung vom Herstellerprotokoll, hier 25 µl) Proteinase K und 200 µl AL Puffer hinzufügen und durch Vortexen mischen
- Für 30 Minuten bei 56°C auf dem Thermorüttler mit 550 rpm inkubieren
- 200 µl Ethanol (96–100%) hinzufügen und durch Vortexen sorgfältig zu einer homogenen Lösung mischen
- Das Gemisch einschließlich etwaiger Präzipitate in die DNeasy Mini spin Säule, welche einem 2 ml Sammelgefäß aufsitzt, pipettieren und bei 6000 x g 1 Minute lang zentrifugieren. Durchfluss und Sammelgefäß verwerfen
- Die DNeasy Mini spin Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß stecken, 500 µl AW1 Puffer hinzufügen, und für 1 Minute bei 6000 x g zentrifugieren. Durchfluss und Sammelgefäß verwerfen
- Die DNeasy Mini spin Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß stecken, 500 µl AW2 Puffer hinzufügen, und für 3 Minuten bei 20000 x g zentrifugieren, um die DNeasy Membran zu trocknen
- Abweichung vom Herstellerprotokoll: Durchfluss verwerfen und DNeasy Mini spin Säule auf dasselbe Sammelgefäß aufsetzen, erneut 1 Minute bei 20000 x g zentrifugieren. Durchfluss und Sammelgefäß verwerfen
- Die DNeasy Mini spin Säule auf ein sauberes 2 ml Eppendorf Gefäß setzen, und 40 µl (Abweichung vom Herstellerprotokoll, hier 200 µl) AE Puffer direkt auf die DNeasy Membran pipettieren. Für 3 Minuten (Abweichung vom Herstellerprotokoll, hier 1 Minute) bei Raumtemperatur inkubieren und dann für 1 Minute bei 6000 x g zentrifugieren, um zu eluieren

Qualitätskontrolle der DNA:

- 2 µl AE Puffer (*DNeasy Blood and Tissue Kit*) zum Kalibrieren auf die Linse des NanoDrops geben und „blank“ drücken
- Jeweils 2 µl des Eluats auftragen, Probenamen eingeben und messen. Die DNA-Konzentration sollte über 100 ng/µl, der A_{260}/A_{280} Quotient über 1,8 liegen. Ein symmetrischer Absorptionspeak bei 260 nm bestätigt eine hohe Reinheit der DNA

8.4 Protokoll Microarray-Messung

Lineare Amplifikation und Biotin-Markierung:

Clontech Kit Protokoll:

- Einen Mastermix aus 4,9 µl B1 (Markierungspuffer) und 0,1 µl B2 (DNA Polymerase) pro Einzelprobe herstellen. Ein Aliquot von 5 µl in je ein PCR-Mikroreaktionsgefäß pipettieren
- 0,5-1,5 µg DNA in 5 µl Reinstwasser hinzu pipettieren, sodass ein Endvolumen von 10 µl je PCR-Mikroreaktionsgefäß resultiert

- Folgendes Thermocycler-Protokoll durchführen:

Deckel auf 105°C vorheizen	
300 Sekunden 96°C	
45 Zyklen mit	20 Sekunden 50°C
	30 Sekunden 72°C
	20 Sekunden 96°C
Auf 4°C runter kühlen, Temperatur halten	

- Während des PCR-Laufs eine Arbeitsliste (Worklist) am PC erstellen. Diese kann zunächst in Excel angelegt und dann im wordpad (*.txt)-Format gespeichert werden, welches in die testspezifische ArrayMate Software importiert wird. Die Liste sollte folgender Form entsprechen:

position	sampleID	assayID	comment
1	MW-N001	10248	Probe 1
2	MW-N002	10248	Probe 2
3	MW-N003	10248	Probe 3

position = Position im 96 Well Format, d.h. 1=A1, 8=H1, 9=A2 etc.

sampleID = Probenname, hier beispielhaft MW-N001-003 ausgewählt

assayID = 10248 (ID Nummer des *S. aureus* Genotyping Assays)

comment = Kommentar, z.B. interne Probennummer

Microarray:

Clondiag Kit Protokoll:

- Den Thermorüttler auf 55°C vorheizen
- 90 µl des C1 Puffers mit einer Mehrkanalpipette zu jedem Markierungsprodukt hinzufügen, vorsichtig mischen (starkes Mischen resultiert in Schäumen) und beiseitestellen
- Die ArrayStrips aus dem Beutel nehmen und in den weißen Rahmen einsetzen. Der korrekten Orientierung (Datenmatrix Barcode an Reihe A anliegend) und guten Befestigung versichern
- Wells, die nicht benutzt werden, mit einem Deckel verschließen
- 200 µl Reinstwasser zu jedem Well hinzufügen und vorsichtig mit einer Pipette mischen (4 x hoch und runter) ohne die Array Oberfläche zu berühren
- Wasser abziehen und verwerfen
- 200 µl C1 Puffer zu jedem Well hinzufügen
- Für 2 Minuten bei 55°C auf dem Thermorüttler mit 550 rpm inkubieren
- C1 Puffer abziehen und verwerfen
- Jedes Hybridisierungsgemisch (100 µl) in ein vorbereitetes Well des ArrayStrips überführen (extensives Schäumen verhindern)

- Die Wells verschließen und für 1 Stunde bei 55°C auf dem Thermorüttler mit 550 rpm inkubieren
- Reagenz C3 (Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase) und Puffer C4 im Verhältnis 1:100 kombinieren (insgesamt werden später 100 µl C3/C4 pro Well benötigt) und bei Raumtemperatur bis zum Gebrauch beiseitestellen
- Genügend D1 Reagenz (100 µl pro Well) in ein separates Gefäß (z.B. ein steriles Zentrifugenröhrchen) überführen. Bei 20-25°C bis zum Gebrauch beiseitestellen. Bitte beachten: kaltes D1 könnte zu schwachen Signalen führen. D1 unmittelbar vor dem Anfärben zentrifugieren, andernfalls könnten darin enthaltene Klümpchen den Array kontaminieren
- Die ArrayStrips aus dem Thermorüttler herausnehmen und diesen auf 30°C runterkühlen
- Die Wells vorsichtig öffnen und das Hybridisierungsgemisch so vollständig wie möglich abziehen
- Je 200 µl C2 Puffer hinzufügen und vorsichtig mit einer Mehrkanalpipette mischen (4 x hoch und runter) ohne die Array Oberfläche zu berühren
- Die Waschlösung abziehen und werfen
- Den Waschvorgang noch 2 x wiederholen
- Je 100 µl des C3/C4 Gemisches zu jedem Well hinzufügen
- Für 10 Minuten bei 30°C auf dem Thermorüttler mit 550 rpm inkubieren
- Das C3/C4 Gemisch komplett abziehen und werfen
- Je 200 µl des C5 Puffers hinzufügen und vorsichtig mit einer Mehrkanalpipette mischen (4 x hoch und runter) ohne die Array Oberfläche zu berühren
- Die Waschlösung abziehen und werfen
- Diesen Waschvorgang 1 x wiederholen
- Je 100 µl D1 Reagenz zu jedem Well hinzufügen (Überstand des zentrifugierten D1 Reagenzes ohne Präzipitat)
- Bei Raumtemperatur für 5 Minuten ohne Bewegung inkubieren
- Das D1 Reagenz so vollständig wie möglich abziehen und werfen und umgehend analysieren (das gefärbte Präzipitat ist instabil und verblasst langsam)
- Achtung: die Strips müssen unterhalb der Arrays sauber sein und es dürfen keine Luftblasen oder Flüssigkeitsreste in den Wells sein
- Am ArrayMate „next“ drücken (Lesegerät öffnet sich) und vorsichtig den weißen Rahmen mit den ArrayStrips in den Metalladapter einsetzen. Der korrekten Orientierung (Position A1 im Rahmen am Datenmatrix Barcode des Adapters anliegend) und guten Befestigung versichern, andernfalls könnte das Bild außerhalb des Fokus sein
- „next“ drücken. Lesegerät schließt, Analyseprogramm startet, Lesegerät macht Fotos und analysiert automatisch die Daten

8.5 Tabelle der analysierten Gene und ihre Häufigkeit

In der folgenden Tabelle sind alle mittels Microarray detektierten Gene aufgeführt, die Eingang in die Analyse gefunden haben. Neben der übergeordneten Genklasse und der Genabkürzung, wie sie in der gesamten Arbeit verwendet wird, findet sich auch die ungekürzte englische Genbezeichnung. Zusätzlich ist die absolute Häufigkeit der detektierten Gene dargestellt (die bei n=100 auch der relativen Häufigkeit entspricht), unterteilt nach den vier Subgruppen kolonisierende (MM-N) und invasive (MM-OB) Isolate aus Manhiça und kolonisierende (MW-N) und invasive (MW-OB) Isolate aus Münster.

Genklasse	Gen-abkürzung	Absolute Häufigkeit/ Relative Häufigkeit [%]				Genbezeichnung
		MM-N	MM-OB	MW-N	MW-OB	
Resistenzgene	<i>mecA</i>	3	3	0	6	alternate penicillin binding protein 2, defining MRSA
	<i>blaZ</i>	89	91	66	72	beta-lactamase
	<i>ermA</i>	0	2	4	8	rRNA adenine N-6-methyltransferase, erythromycin/clindamycin resistance
	<i>ermB</i>	0	0	0	0	erythromycin/clindamycin resistance
	<i>ermC</i>	32	22	5	7	erythromycin/clindamycin resistance
	<i>lnuA</i>	0	0	0	0	Lincosamid-Nucleotidyltransferase
	<i>msrA</i>	0	0	0	2	energy-dependent efflux of erythromycin
	<i>mefA</i>	0	0	0	0	macrolide efflux protein A
	<i>mphC</i>	0	0	0	2	probable lysylphosphatidyl-glycerol synthetase
	<i>vatA</i>	0	0	0	0	virginiamycin A acetyltransferase
	<i>vatB</i>	0	0	0	0	acetyltransferase inactivating streptogramin A
	<i>vgaA</i>	0	0	0	0	ATP binding protein, streptogramin-A-resistance
	<i>vgBA</i>	0	0	0	0	virginiamycin B hydrolase
	<i>aacA-aphD</i>	5	2	1	6	bifunctional enzyme Aac/Aph, gentamicin resistance
	<i>aadD</i>	0	0	2	3	aminoglycoside adenylyltransferase, tobramycin resistance
	<i>aphA3</i>	0	0	0	1	3'5'-aminoglycoside phosphotransferase, neo-/kanamycin resistance
	<i>sat</i>	0	0	0	1	streptothricine-acetyltransferase
	<i>dfpS1</i>	6	2	1	2	dihydrofolate reductase type 1
	<i>far1</i>	0	0	0	0	fusidic acid resistance
	<i>fusC</i>	0	0	0	0	hypothetical protein associated with fusidic acid resistance
	<i>mupA</i>	0	0	0	0	mupirocin resistance protein
	<i>tetK</i>	33	21	4	5	tetracycline-resistance
	<i>tetM</i>	16	24	0	2	tetracycline-resistance
	<i>cat</i>	4	6	0	3	chloramphenicol acetyltransferase
	<i>cfr</i>	0	0	0	0	23S rRNA methyltransferase
	<i>fexA</i>	0	0	0	0	chloramphenicol/florfenicol exporter
	<i>fosB</i>	65	79	59	50	metallothiol transferase

	<i>qacA</i>	0	0	0	2	quaternary ammonium compound resistance protein A
	<i>qacC</i>	2	1	1	2	quaternary ammonium compound resistance protein C
	<i>sdrM</i>	97	100	93	90	Transport-/Effluxprotein
	<i>vanA</i>	0	0	0	0	vancomycin resistance gene
	<i>vanB</i>	0	0	0	0	vancomycin resistance gene from enterococci and Clostridium
	<i>vanZ</i>	0	0	0	0	teicoplanin resistance gene from enterococci
klassische Toxingene	<i>tst</i>	8	4	15	9	toxic shock syndrome toxin 1
	<i>sea</i>	19	12	8	8	enterotoxin A
	<i>seb</i>	27	41	6	9	enterotoxin B
	<i>sec</i>	16	9	15	23	enterotoxin C
	<i>sed</i>	9	1	3	16	enterotoxin D
	<i>see</i>	0	0	0	0	enterotoxin E
	<i>seh</i>	10	3	6	7	enterotoxin H
	<i>sej</i>	4	2	4	8	enterotoxin J
	<i>sek</i>	19	11	6	3	enterotoxin K
	<i>sel</i>	16	9	15	23	enterotoxin L
	<i>egc</i>	41	58	56	61	egc cluster
	<i>seq</i>	19	11	6	3	enterotoxin Q
	<i>ser</i>	3	2	3	7	enterotoxin R
	<i>ORF CM14</i>	26	41	8	8	enterotoxin-like protein ORF CM14
	<i>etA</i>	7	7	6	3	exfoliative toxin serotype A
	<i>etB</i>	6	6	2	1	exfoliative toxin serotype B
	<i>etD</i>	9	6	2	2	exfoliative toxin D
Hämolysin- und Proteasegene	<i>lukF</i>	100	99	97	99	haemolysin gamma / leukocidin, component B
	<i>lukS</i>	89	96	84	81	haemolysin gamma / leukocidin, component C
	<i>hlgA</i>	100	99	93	99	haemolysin gamma, component A
	<i>PVL</i>	39	54	0	3	Panton Valentine leukocidin F component
	<i>lukM</i>	0	0	1	0	S component from hypothetical leukocidin from ruminants
	<i>lukD</i>	83	81	53	47	leukocidin D component
	<i>lukE</i>	83	82	47	46	leukocidin E component
	<i>hl</i>	89	96	99	100	putative membrane protein
	<i>hla</i>	99	100	97	99	haemolysin alpha
	<i>hlIII</i>	97	100	95	90	putative membrane protein
	<i>hIb</i>	70	72	58	68	haemolysin beta
	<i>sak</i>	82	80	73	82	staphylo-kinase
	<i>chp</i>	46	44	61	61	chemotaxis-inhibiting protein (CHIPS)
	<i>scn</i>	98	100	89	92	Staphyl. Complement inhibitor
	<i>edinA</i>	2	6	0	0	epidermal cell differen-tiation inhibitor
	<i>edinB</i>	20	10	2	2	epidermal cell differen-tiation inhibitor B
	<i>edinC</i>	5	4	1	0	epidermal cell differen-tiation inhibitor C
	<i>ACME</i>	0	0	0	0	ACME-locus
	<i>spIA</i>	78	79	54	48	serin- protease A
	<i>spIB</i>	82	87	57	48	serin- protease B
	<i>spIE</i>	44	35	53	49	serin- protease E
	<i>sspA</i>	99	99	100	100	glutamylendopeptidase
	<i>sspB</i>	100	100	100	100	staphopain B, protease

	<i>sspP</i>	97	100	98	100	staphopain A (staphylopain A), protease
Superantigen- und Enterotoxin	<i>setC</i>	89	94	82	80	staphyl. exotoxin-like protein
	<i>ssl01/set6</i>	39	55	27	32	staphylococcal superantigen-like protein 1
	<i>ssl03/set8</i>	82	90	56	53	staphylococcal superantigen-like protein 3
	<i>ssl04/set9</i>	80	89	55	48	staphylococcal superantigen-like protein 4
	<i>ssl05/set3</i>	56	45	52	52	staphylococcal superantigen-like protein 5
	<i>ssl06/set21</i>	64	73	41	28	staphylococcal superantigen-like protein 6
	<i>ssl08/set12</i>	75	72	49	47	staphylococcal superantigen-like protein 8
	<i>ssl09/set5</i>	86	89	62	60	staphylococcal superantigen-like protein 9
	<i>setB3</i>	94	94	59	52	staphylococcal exotoxin-like protein, third locus
	<i>setB2</i>	94	89	53	51	staphylococcal exotoxin-like protein, second locus
	<i>setB1</i>	95	92	75	69	staphylococcal exotoxin-like protein
Kapsel und Biofilm	<i>cap 1</i>	0	2	0	0	Capsule type 1
	<i>cap 5</i>	38	20	32	35	Capsule type 5
	<i>cap 8</i>	62	80	68	65	Capsule type 8
	<i>icaA</i>	100	99	100	100	intercellular adhesion protein A
	<i>icaC</i>	88	96	95	100	intercellular adhesion protein C
	<i>icaD</i>	100	99	100	100	biofilm PIA synthesis protein D
	<i>bap</i>	0	0	0	0	surface protein involved in biofilm formation
Adhäsionsfaktor-/MSCRAMM Gene	<i>bbp</i>	99	96	92	93	bone sialoprotein-binding protein
	<i>clfA</i>	100	100	100	100	clumping factor A
	<i>clfB</i>	100	100	100	100	clumping factor B
	<i>cna</i>	54	57	47	56	collagen-binding adhesin
	<i>ebh</i>	97	100	91	89	cell wall associated fibronectin-binding protein
	<i>ebpS</i>	100	100	100	100	cell surface elastin binding protein
	<i>eno</i>	100	100	100	100	enolase
	<i>fib</i>	84	90	60	53	fibrinogen binding protein (19 kDa)
	<i>fnbA</i>	99	100	97	100	fibronectin-binding protein A
	<i>fnbB</i>	99	98	85	90	fibronectin-binding protein B
	<i>map</i>	81	94	99	98	Major histocompatibility complex class II analog protein
	<i>sasG</i>	64	43	39	41	Staphylococcus aureus surface protein G
	<i>sdrC</i>	89	96	100	100	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein C
	<i>sdrD</i>	96	95	83	85	Ser-Asp rich fibrinogen-/bone sialoprotein-binding protein D
	<i>vwb</i>	100	100	99	100	van Willebrand factor binding protein